

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE  
PROF. DR. MED. DR. RER. NAT. ANDRÉ GESSNER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ENTWICKLUNG EINER T-ZELLDIAGNOSTIK FÜR VIRALE ERKRANKUNGEN IM  
ELISPOT-FORMAT

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Barbara Koch

2018



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE  
PROF. DR. MED. DR. RER. NAT. ANDRÉ GESSNER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ENTWICKLUNG EINER T-ZELLDIAGNOSTIK FÜR VIRALE ERKRANKUNGEN IM  
ELISPOT-FORMAT

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Barbara Koch

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. André Gessner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernd Salzberger
Tag der mündlichen Prüfung:	Dienstag, den 19.03.2019

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1. T-Zellvermittelte Immunantwort .....	9
1.1.1. Entstehung und Differenzierung der T-Zellpopulationen .....	9
1.1.2. CD4+-T-Zellen .....	10
1.1.3. CD8+-T-Zellen .....	11
1.1.4. Interferon- $\gamma$ .....	12
1.1.5. Antigenpräsentation .....	13
1.1.5.1. Antigenerkennung .....	13
1.1.5.2. T-Zellaktivierung .....	13
1.1.5.3. Proliferation .....	14
1.1.5.4. Differenzierung und Migration .....	14
1.1.6. Immunologisches Gedächtnis .....	14
1.2. Adenoviren .....	15
1.2.1. Einteilung .....	15
1.2.2. Epidemiologie .....	16
1.2.3. Virusaufbau .....	17
1.2.3.1. Hexon .....	18
1.2.4. Infektionszyklus .....	19
1.2.5. Übertragung, Pathogenese und Immunreaktion .....	20
1.2.6. Klinik .....	21
1.2.7. Diagnostik und Therapie .....	22
1.3. Herpesviren .....	23
1.3.1. Einteilung .....	23
1.3.2. Epidemiologie .....	23

1.3.3.	Virusaufbau .....	23
1.3.4.	Virusproteine .....	25
1.3.5.	Infektionszyklus und Replikation .....	25
1.3.6.	Übertragung, Pathogenese und Immunreaktion.....	27
1.3.6.1.	HSV-1.....	27
1.3.6.2.	VZV .....	28
1.3.7.	Klinik .....	29
1.3.7.1.	HSV-1.....	29
1.3.7.2.	VZV .....	30
1.3.8.	Diagnostik und Therapie .....	32
1.3.8.1.	HSV-1.....	32
1.3.8.2.	VZV .....	32
1.4.	ELISpot .....	33
1.5.	Zielsetzung der Arbeit .....	34
2.	Material und Methoden .....	38
2.1.	Material .....	38
2.1.1.	Humane Zelllinien .....	38
2.1.2.	Nährmedien und Zusatzstoffe .....	38
2.1.3.	Viren.....	39
2.1.4.	Antikörper.....	40
2.1.4.1.	Antikörper für den Focus Forming Assay .....	40
2.1.4.2.	Antikörper für den ELISpot-Assay .....	41
2.1.5.	PBMC.....	42
2.1.6.	Hexonproteine.....	42
2.1.7.	ELISA-Testkits und Kontrollen .....	42
2.2.	Methoden .....	44

2.2.1.	Kultivierung und Lagerung der humanen Zelllinien .....	44
2.2.2.	Virusanzucht .....	44
2.2.2.1.	Infektion der H1299-Zellen mit Adenoviren .....	44
2.2.2.2.	Infektion der MRC-5-Zellen mit HSV-1 .....	45
2.2.2.3.	Infektion der HFF-Zellen mit VZV .....	46
2.2.2.4.	Virusernte .....	47
2.2.2.5.	Aufschluss der Zellen .....	47
2.2.3.	Titerbestimmung .....	48
2.2.3.1.	Sequenzierung und Titerbestimmung mittels PCR .....	48
2.2.3.2.	Titerbestimmung mittels Focus Forming Assay (FFA) .....	48
2.2.3.3.	Titerbestimmung mittels Plaque Assay .....	50
2.2.4.	Inaktivierung der Viren .....	51
2.2.4.1.	Inaktivierung mittels Hitze .....	51
2.2.4.2.	Inaktivierung mittels UV .....	52
2.2.5.	ELISpot-Assay .....	52
2.2.5.1.	Isolierung der PBMC .....	55
2.2.6.	ELISA .....	56
2.2.6.1.	Anti-Adenovirus-ELISA (IgG) Euroimmun .....	56
2.2.6.2.	Serion ELISA classic IgG .....	57
3.	Ergebnisse .....	58
3.1.	Virusanzucht .....	58
3.1.1.	Auswahl der Zellen und Nährmedien .....	58
3.1.1.1.	Versuch des Mediumwechsels bei H1299 .....	58
3.1.1.2.	Versuch des Mediumwechsels bei MRC-5 .....	59
3.1.2.	Etablierung der Virusanzucht .....	60
3.1.2.1.	Etablierung der Anzucht der Adenoviren .....	60

3.1.2.2. Etablierung der Anzucht des VZV .....	61
3.2. Titerbestimmung.....	62
3.2.1. Übersicht über die angezüchteten Viren .....	62
3.2.2. Titerbestimmung mittels FFA .....	63
3.2.3. Titerbestimmung mittels Plaque-Assay .....	65
3.3. Virusinaktivierung .....	65
3.3.1. Inaktivierungsversuch der Adenoviren .....	65
3.3.2. Inaktivierungsversuch des HSV-1 mittels UV .....	66
3.4. Auswertung des ELISpot.....	67
3.4.1. Alters- und Geschlechterverteilung der Probanden.....	67
3.4.2. Ergebnisse ELISpot .....	68
3.4.2.1. Auswertung der Ergebnisse .....	68
3.4.2.1.1. Gesamtauswertung Adenoviren .....	68
3.4.2.1.2. Ermittlung des optimalen Titors des AdV-12 .....	71
3.4.2.1.3. Auswertung der rekombinanten Hexonproteine .....	72
3.4.2.1.3.1. Ermittlung der optimalen Konzentration.....	72
3.4.2.1.3.2. Hexon 2 .....	73
3.4.2.1.3.3. Hexon 5 .....	74
3.4.2.1.3.4. Gesamtauswertung Hexonproteine .....	75
3.4.2.1.4. Vergleich von Hexon 2 und Hexon 5.....	76
3.4.2.1.5. Vergleich von Adenovirus und Hexon .....	77
3.4.2.1.5.1. Vergleich von AdV-2 und Hexon 2.....	77
3.4.2.1.5.2. Vergleich von AdV-5 und Hexon 5.....	78
3.4.2.1.6. Inaktivierung.....	79
3.4.2.1.6.1. Inaktivierung mittels Hitze.....	79
3.4.2.1.6.2. Inaktivierung mittels UV .....	80



3.4.2.1.7.	Auswertung HSV-1.....	81
3.4.2.1.7.1.	Gesamtauswertung HSV-1 .....	81
3.4.2.1.7.2.	Inaktivierung .....	82
3.4.2.1.7.2.1.	Inaktivierung mittels Hitze .....	82
3.4.2.1.7.2.2.	Inaktivierung mittels UV .....	83
3.4.2.1.8.	Auswertung VZV .....	84
3.4.2.1.8.1.	Gesamtauswertung VZV .....	84
3.4.2.1.8.2.	Inaktivierung .....	85
3.4.2.1.8.2.1.	Inaktivierung mittels Hitze .....	85
3.4.3.	Vergleich Immunoassays .....	86
3.4.3.1.	Vergleich ELISpot - ELISA – Adenoviren .....	87
3.4.3.2.	Vergleich ELISpot - ELISA – HSV-1 .....	88
3.4.3.3.	Vergleich ELISpot – ELISA – VZV.....	89
4.	Diskussion.....	90
4.1.	Anzucht der Viren in FKS-freiem Medium .....	90
4.2.	Anzucht des VZV.....	90
4.3.	Bestimmung des Virustiters.....	91
4.4.	Adenoviren .....	92
4.4.1.	Ergebnis des ELISpot für Adenoviren .....	92
4.4.2.	Hexonprotein als Antigen im ELISpot.....	93
4.4.3.	Bestimmung der optimalen Konzentration des AdV-12.....	95
4.4.4.	Inaktivierung mit Hitze und UV im ELISpot .....	96
4.4.5.	Vergleich von ELISpot und ELISA.....	96
4.5.	HSV-1.....	97
4.5.1.	HSV-1 im ELISpot.....	97
4.5.2.	Inaktivierung mit Hitze und UV im ELISpot .....	98

4.5.3.	Vergleich von ELISpot und ELISA.....	98
4.6.	VZV .....	99
4.6.1.	VZV im ELISpot.....	99
4.6.2.	Inaktivierung mit Hitze im ELISpot .....	100
4.6.3.	Vergleich von ELISpot und ELISA.....	100
5.	Zusammenfassung.....	101
6.	Anhang .....	103
6.1.	Tabellenverzeichnis.....	103
6.2.	Abbildungsverzeichnis.....	104
6.3.	Abkürzungsverzeichnis .....	105
7.	Literatur.....	107
8.	Danksagung.....	123
9.	Lebenslauf.....	124

## **1. Einleitung**

### **1.1. T-Zellvermittelte Immunantwort**

#### **1.1.1. Entstehung und Differenzierung der T-Zellpopulationen**

Die Zellen der adaptiven Immunantwort können grob in zwei Gruppen unterteilt werden: Antigenpräsentierende Zellen (APC) und Lymphozyten. Zu den APCs werden dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen gezählt. Die Gruppe der Lymphozyten bilden T-Zellen, sowie B-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Während B-Lymphozyten im Knochenmark heranreifen (bone marrow) und für den humoralen Arm der Immunantwort verantwortlich sind, werden Vorläufer der T-Zellen im Thymus gebildet, was auch zu ihrer Namensgebung geführt hat. Ihre Aufgabe besteht in der zellulären Immunregulation. Die Unterscheidung der verschiedenen Lymphozyten erfolgt zudem anhand ihrer Antigenrezeptoren sowie ihrer Markerproteine, den sogenannten CD-Molekülen (cluster-of-differentiation-antigens). Hierbei handelt es sich um Zellmembranproteine, welche in vitro von monoklonalen Antikörpern erkannt werden können und so eine Differenzierung verschiedener Lymphozytenpopulationen erlauben. Die wichtigen Akteure für den ELISpot sind CD4+- und CD8+-T-Zellen, die abgesehen von ihrem unterschiedlichen Membranproteinmuster auch unterschiedliche Funktionen ausüben. Die Differenzierung dieser Zellen findet während der Reifung im Thymus, im Sinne einer positiven Selektion, statt. Nachdem bereits alle Zellen zur Apoptose veranlasst wurden, welche keine Prä-T-Antigenrezeptoren und vollständige T-Zellrezeptoren (TCR) exprimiert hatten, werden den übriggebliebenen unreifen T-Zellen Komplexe aus MHC-Molekülen und Peptiden präsentiert. Zellen, die diesen Komplex mit einer zu hohen Affinität binden, begehen Apoptose. Unreife T-Zellen, welche das MHC-I-Molekül binden, werden zu CD8+-T-Zellen. Bei Erkennen von MHC-II-Molekülen reifen die Vorläuferzellen zu CD4+-T-Zellen [1, 2]. Beide Subpopulationen besitzen einen heterodimeren T-Zellrezeptor aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, der zur Klasse der Immunglobuline gehört und mit dem jeweiligen CD-Protein in Verbindung steht. Die Verankerung des Rezeptors erfolgt hierbei über das carboxyterminale Ende. Der oberflächenexponierte Anteil besteht aus einer konstanten und einer variablen Domäne, wobei letztere für die Bindung des Komplexes aus MHC-Molekül und Peptid zuständig ist und somit dessen Spezifität definiert. Als zweite CD-Proteingruppe ist der TCR zudem mit dem CD3-Proteinkomplex assoziiert, über den die Signale vom Extra- in den Intrazellularraum

vermittelt werden [3]. Nach Reifung der T-Zellen im Thymus verlassen diese das Organ über die Blutbahn und lassen sich als sogenannte naive T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen nieder. Die endgültige Differenzierung, mit der damit verbundenen Ausübung ihrer spezifischen Funktion, findet erst bei Kontakt mit dem passenden Antigen statt und ist von verschiedenen Zytokinen abhängig.

### 1.1.2. CD4+-T-Zellen

Eine weitere Bezeichnung für diese T-Zellsubpopulation ist T-Helferzelle. Sie kann wiederum in weitere Untergruppen geteilt werden. Die Unterscheidung zwischen ihnen erfolgt hier durch das individuelle Zytokinprofil sowie deren spezifischer Funktion in der Immunantwort.

Typ 1 T-Helferzellen (T<sub>H</sub>1)-Zellen sezernieren Interleukin 2 (IL-2) und Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), wodurch es zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, Makrophagen und weiteren T-Helferzellen kommt. Dadurch spielt diese Zellpopulation eine wichtige Rolle bei der zellulären Immunantwort und somit bei der Bekämpfung intrazellulärer Erreger, wie z.B. Viren. Doch auch die Aktivierung von B-Zellen zur IgG-Antikörperproduktion gehört zu ihren Aufgaben. Ihre Differenzierung aus einer naiven T-Zelle erfolgt durch die Sekretion von IL-2 der antigenpräsentierenden Zellen. Das Zytokinprofil der Typ 2 T-Helferzellen (T<sub>H</sub>2)-Zellen ist mit IL-4, -5 und -10 etwas breiter. Diese Subpopulation entsteht durch die Freisetzung des Zytokins IL-4. Ihre Aufgabe ist wiederum die Stimulation von naiven B-Zellen zur Differenzierung in antikörpersezernierende Plasmazellen. Des Weiteren vermitteln sie den Isotypwechsel von IgG<sub>1</sub> zu IgE-Antikörpern und leisten einen wichtigen Anteil zur Bekämpfung von mehrzelligen extrazellulären Parasiten [2]. Neben diesen beiden Zelltypen existieren unter den CD4+-T-Zellen noch zwei weitere Zellpopulationen. Die T<sub>H</sub>17-Zellen sind eine noch nicht stark erforschte Subklasse der CD4+-T-Zellen. Vermutlich erfolgt die Stimulation zu ihrer Differenzierung über IL-6 und TGF- $\beta$ , wobei dieser Prozess wahrscheinlich über andere Mechanismen erfolgt als bei den T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen. Die Zellen selbst sezernieren IL-17 und scheinen in der Abwehr extrazellulärer gram-negativer Bakterien und Pilze von Bedeutung zu sein, indem sie aktivierte Neutrophile rekrutieren.

Die letzte bisher entdeckte Subpopulation ist die der regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>). Von ihnen gibt es wiederum einige Phänotypen. Ihr Einfluss besteht sowohl bei der

angeborenen als auch der adaptiven Immunabwehr und zeichnet sich, wie am Namen erkennbar ist, durch die Regulation der Immunantwort aus. So können sie über Sekretion von TGF- $\beta$  und IL-10 Immunantworten unterdrücken, um übermäßigem Gewebeschaden durch inflammatorische und zelltoxische Prozesse vorzubeugen. Bei einem Überangebot von T<sub>regs</sub> besteht die Gefahr, dass maligne veränderte Zellen und auch Infekte nur unzureichend bekämpft werden können. Hierdurch steigt das Infekt- als auch das Krebsrisiko. Existieren wiederum zu wenige dieser Zellen im Körper, kann es zu überschießenden Immunreaktionen kommen. Des Weiteren können T<sub>regs</sub> an Autoimmunerkrankungen beteiligt sein, wenn die Unterdrückung autoreaktiver T-Zellen ausbleibt, wodurch es zu starken Gewebeschäden kommen kann.

### **1.1.3. CD8+-T-Zellen**

Die Aufgabe der CD8+-T-Zellen besteht in der Zerstörung infizierter, z.B. virusbefallener Zellen. Sie sind in der Lage, mit Hilfe ihres TCRs den Komplex aus MHC-I-Molekül und Fremdpeptid zu erkennen, welchen die befallene Zelle an ihrer Zelloberfläche präsentiert. Durch die Stimulation mittels IL-2 und INF- $\gamma$  durch T-Helferzellen und weiteren Zytokinen, die durch Zellen der angeborenen Immunantwort sezerniert werden, kommt es zuvor zu einer Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen. Nach Erkennung der Zellen und der Bindung an diese, erfolgt die Freisetzung von Granzymen und Perforinen, wodurch es zur Zerstörung der Zelle kommt. Die Perforine lagern sich in die Zellmembran ein und bilden Poren, wodurch die Zellyse eintritt. Granzyme sind Proteine, die nach Eindringen in die Zielzelle in der Lage sind, Apoptose zu induzieren. Zudem verfügen zytotoxische T-Zellen über einen Fas-Liganden, mit dem sie an Fas-Rezeptoren auf der Zellmembranoberfläche der zu eliminierenden Zelle binden und hierdurch den programmierten Zelltod induzieren können. Neben diesen zellulären Mechanismen sind die CD8+-T-Zellen auch zur Zytokin-Sekretion fähig [3, 4] Mit Hilfe von TNF- $\alpha$  veranlassen sie Zellen mit entsprechendem Rezeptor zur Apoptose. Über INF- $\gamma$  wiederum kommt es zu einer Verstärkung der Makrophagen-Aktivierung. Zudem scheint es eine maßgebliche Rolle bei der Bekämpfung von Viren und anderen intrazellulären Erregern zu spielen, indem sie Zielzellen durch Hochregulierung von MHC-I-Molekülen den zytotoxischen T-Zellen leichter zugänglich machten. Auch eine Induktion der Expression von MHC-II-

Molekülen wird diskutiert, mit der Folge einer besseren Überwachung durch T-Helferzellen [1].

#### **1.1.4. Interferon- $\gamma$**

Interferone werden unterteilt in Interferone vom Typ-I und Typ-II. Während 8 Vertreter, darunter INF- $\alpha$  und INF- $\beta$ , den Typ-I Interferonen angehören, ist INF- $\gamma$  der einzige Vertreter der Typ-II-Klasse. Der Name dieser Proteingruppe leitet sich von ihrem Verhalten in mit Viren infizierten Zellkulturen ab, in denen sie bei der Virusreplikation interferieren. Das säurelabile Molekül ist bei allen Säugetieren anzutreffen. In vivo liegt es als Homodimer aus glycosilierten Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 34 kDa vor [5, 6] und unterscheidet sich in seinem Aufbau vollkommen von dem der Typ-I-Interferone. Durch die Induktion der Expression von MHC-II- und MHC-I-Molekülen verstärkt INF- $\gamma$  die spezifische Immunantwort. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Zytokinfreisetzung und der Steigerung der Aktivität von Natürlichen Killerzellen, Makrophagen und anderen mononukleären Phagozyten [7]. Auch die Reifung und Differenzierung sowohl von B-Zellen als auch von zytotoxischen T-Zellen wird durch das Molekül forciert. Hierdurch kommt INF- $\gamma$  eine wichtige Rolle bei der zellvermittelten sowie der humoralen Immunantwort zu. Durch die Unterstützung der zytotoxischen Immunantwort hat es auch eine starke antivirale Wirkung, was beispielsweise beim Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV-1) sehr deutlich wird [8, 9]. Hier kommt es über verschiedene Wege zu einer Beeinträchtigung des Mikrotubulinetzes, welches das HSV-1 für seinen Transport in den Nucleus und während des Replikationszyklus benötigt. Molekularbiologisch beruhen all diese Funktionen auf den von INF- $\gamma$  kontrollierten Genen. Über den INF- $\gamma$ -Rezeptor1 (INF $\gamma$ R1) bindet das Protein an die Zielzelle. Im darauffolgenden Schritt kommt es zu einer Komplexbildung mit dem INF $\gamma$ R2. Über die mit den Rezeptoren assoziierten Kinasen Jak1 und Jak2 erfolgt eine Phosphorylierung von Tyrosinresten des INF $\gamma$ R1, wodurch wiederum der Transkriptionsfaktor Stat1 phosphoryliert wird und dieser daraufhin in den Zellkern gelangt [10]. Hier lagert sich das Protein an vorgegebene Gensequenzen, sogenannten „interferon stimulated response element“ (ISRE) an und bewirkt die Transkription der gewünschten Genprodukte [3]. Gebildet und sezerniert wird das INF- $\gamma$  vorwiegend von T<sub>H</sub>1-Zellen, aber auch von NK-Zellen und CD8+-T-Zellen [11].

### **1.1.5. Antigenpräsentation**

#### **1.1.5.1. Antigenerkennung**

Die Antigenerkennung durch T-Zellen ist nur mit Hilfe von MHC-Molekülen möglich. Diese sind membrangebundene Glykoproteine, die der Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche dienen und durch eine Gruppe von Genen auf dem Chromosom 6 kodiert werden. Der Name „major histocompatibility complex“ beruht auf ihrem Einfluss auf die Verträglichkeit, bzw. die Abstoßung von allogenen Gewebetransplantaten. Die Molekülgruppe ist auch unter dem Synonym HLA (Human Leukocyte Antigen)-Antigen bekannt, da sie zuerst durch Antikörper auf Leukozyten entdeckt wurde. Die hochpolymorphen Bereiche der MHC-Gene weisen zwei verschiedene Sets auf. Ein Locus, welcher für MHC-I- und einer, in dem für MHC-II-Moleküle kodiert wird [1]. Für jedes Molekül existieren jeweils drei verschiedene Gene: HLA-A, -B, -C für das MHC-I, HLA-DP, -DQ, -DR für das MHC-II-Molekül. Die kodominante Vererbung dieser Allele und der Polymorphismus, welchen diese Gene aufweisen, führen zu einem für jeden Menschen individuellen HLA-Muster und damit zu der Eigenschaft der Selbst- und Fremderkennung. MHC-I-Moleküle befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen. Kommt es zum Befall der Zelle durch einen Erreger, zum Beispiel durch ein Viruspartikel, werden virale Peptide, die in der Zelle synthetisiert werden von einem MHC-Molekül gebunden und auf die Zelloberfläche transportiert. Hierdurch wird es cytotoxischen T-Zellen zugänglich gemacht. MHC-II-Proteine sind ausschließlich auf APCs anzufinden. MHC-Proteine der Klasse II präsentieren extrazelluläre Peptide, die durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wurden. Dieser Komplex wird durch CD4+-T-Zellen erkannt. Die Erkennung eines Antigens gelingt also nur, wenn die T-Zelle mit dem TCR an ein MHC-Molekül bindet, welches mit einem Peptid beladen ist und der TCR den Komplex aus Molekül und Peptid spezifisch erkennt. Dieser Mechanismus wird MHC-Restriktion genannt [2].

#### **1.1.5.2. T-Zellaktivierung**

Nach der Erkennung eines Antigens kommt es zur Aktivierung der T-Zelle. Diese findet stets über dendritische Zellen statt, welche das infektiöse Partikel bereits durch Phagozytose meist am Eintrittsort wie Haut und Schleimhäuten aufgenommen haben und benötigt mehrere Signalschritte [1, 2]. Das erste Signal stellt die Bindung von TCR

und MHC/Peptid-Komplex dar. Das zweite Signal erfolgt durch diverse kostimulatorische Moleküle zwischen APC und T-Zelle. Die Wirkung von weiteren membrangebundenen Molekülen und die Sekretion von Zytokinen durch die APC werden als drittes Signal bezeichnet und sind entscheidend für die Differenzierung der Zelle. Nach dem Prinzip der Kreuzpräsentation können dendritische Zellen auch CD8+-T-Zellen aktivieren [12], wobei hier besonders bei viralen Infektionen noch eine zusätzliche Aktivierung durch T-Helferzellen stattfindet.

#### **1.1.5.3. Proliferation**

Im Anschluss an die Aktivierung kommt es zur klonalen Expansion der naiven T-Zellen. Dies erfolgt durch die Ausschüttung von IL-2 durch die T-Zellen selbst und durch Eigenstimulation mittels IL-2-Rezeptor [13]. Die klonale Expansion der CD4+-T-Zellen ist hierbei nicht so stark ausgeprägt wie die der CD8+-T-Zellen. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass CD8+-T-Zellen zur Bekämpfung befallener Zellen in höherer Anzahl vorhanden sein müssen als CD4+-T-Zellen, welche regulatorische Funktionen in der Immunantwort übernehmen [2].

#### **1.1.5.4. Differenzierung und Migration**

In einem dritten Schritt erfolgt die Differenzierung der naiven T-Zellen zu Effektorzellen. Durch eine Veränderung der Genexpression verändert sich das Zytokinprofil der Zellen. Die spezifische Genexpression charakterisiert nicht nur die Unterschiede zwischen naiven und differenzierten Zellen, sondern auch, besonders in Bezug auf CD4+ T-Zellen, die Untergruppen der T-Helferzellen.

Da die Antigenpräsentation und alle weiteren Schritte bis zur Differenzierung der Zelle in sekundärem lymphatischem Gewebe stattfinden, verlassen die Effektorzellen dieses, um über die Blutbahn an den Ort der Infektion in das entsprechende periphere Gewebe zu gelangen und dort ihre spezifische Funktion zu übernehmen [2].

#### **1.1.6. Immunologisches Gedächtnis**

Nach jeder Exposition mit einem neuen Erreger kommt es neben der Bildung von Effektorzellen auch zur Bildung einer weiteren Zellpopulation, den Gedächtniszellen.



Diese sorgen für einen Schutz vor einer Reinfektion im Sinne eines immunologischen Gedächtnisses. Hierbei wird zwischen Effektor-T-Gedächtniszellen ( $T_{em}$ ) und T-Gedächtniszellen ( $T_{cm}$ ) unterschieden [1].  $T_{em}$  zirkulieren bevorzugt in peripherem Gewebe, um dort, im Falle eines erneuten Antigenkontakts, schnell klonal expandieren und eine effektive Immunantwort auslösen zu können.  $T_{cm}$  halten sich vorrangig in sekundär lymphatischem Gewebe auf [14]. Durch erneuten Kontakt mit dem Antigen kommt es zur Reaktivierung und Differenzierung zu Effektorzellen, wodurch es dem Körper gelingt, eine Immunisierung gegen eine Vielzahl von Erregern aufzubauen. Auf diesen Erkenntnissen beruht das Prinzip von Impfungen. Auch im ELISpot wird diese Eigenschaft genutzt.

## **1.2. Adenoviren**

Die Adenoviren wurden im Jahre 1953 durch einen Zufall entdeckt. Bei dem Versuch, Zellkulturen aus Rachenmandeln und anderem adenoidem Gewebe herzustellen, wurde nach einiger Zeit ein zytopathischer Effekt in diesen Zellen beobachtet [15]. Zu Beginn als „adenoid degenerating agent“ bezeichnet, wurde der Name bei der Identifizierung des Erregers als Virus in Adenovirus umbenannt.

### **1.2.1. Einteilung**

Die Familie der Adenoviridae umfasst fünf Genera. Die humanen Adenoviren gehören zum Genus der Mastadenoviren, welche gleichzeitig die meisten Virusspezies umfasst, die allesamt Säugetiere als Wirt besitzen. Neben den Mastadenoviren gibt es noch weitere Genera, welche jedoch nicht den Menschen befallen und aus diesem Grund hier nicht näher beschrieben werden sollen.

Die humanen Adenoviren werden weiter in die sieben Spezies A-G unterteilt [17] und diese wiederum in 52 Serotypen. Die Einteilung der Serotypen erfolgt anhand der Sequenzähnlichkeit. So wird ein Serotyp einer Spezies zugeordnet, wenn die Antikörper gegen die Oberflächenproteine nicht kreuzneutralisierend sind [18] und der phylogenetische Abstand mehr als zehn Prozent beträgt. In den meisten Fällen weisen die Serotypen einer Spezies einen ähnlichen Organotropismus und damit ein ähnliches Krankheitsbild auf.

Spezies	Serotypen	Tropismus
A	12, 18, 31	Darm
B1	3, 7, 16, 21, 50	Respirationstrakt, Auge
B2	11, 14, 34, 35	Niere, Blase, Respirationstrakt, Auge
C	1, 2, 5, 6	Respirationstrakt, Auge, Persistenz in Lymphozyten
D	8- 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36, 37-39, 42-49, 51	Auge
E	4	Respirationstrakt, Auge
F	40, 41	Darm
G	52	Darm

Tabelle 1: Übersicht über die bekannten Spezies der Adenoviren, deren zugehörigen Serotypen sowie dem jeweiligen Organotropismus

### 1.2.2. Epidemiologie

Adenoviren sind zwar weltweit endemisch, jedoch weisen die humanpathogenen Adenoviren eine speziesspezifische Häufigkeitsverteilung auf, welche auf dem Organotropismus und der Art der durch die jeweiligen Serotypen ausgelösten Krankheiten beruht [19]. So sind Serotypen der Spezies B1 (u.a. Serotypen 3 und 7), welche Infektionen des Respirationstrakts verursachen, epidemisch und werden besonders im Winter isoliert. Ähnlich verhält es sich mit der Spezies C, deren Serotypen, u.a. 1,2,5 und 6, ebenfalls respiratorische Beschwerden verursachen und endemisch verbreitet sind. Diese werden meist bei Kleinkindern und Jugendlichen

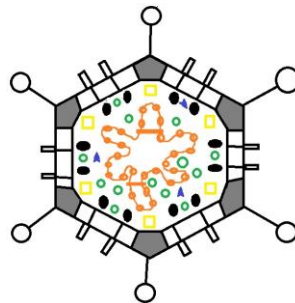
nachgewiesen. Eine weitere häufig vorkommende Gruppe sind die Vertreter der Spezies F, welche epidemisch auftreten und besonders bei Säuglingen und Kleinkindern zu Infektionen des Gastrointestinaltrakts führen. Der Serotyp 8 stellt einen typischen Verursacher endemischer Ausbrüche in Form von Entzündungen der Konjunktiven dar und tritt häufig im Sommer durch Übertragung in Schwimmbädern oder in „unhygienisch“ geführten Augenarztpraxen auf [3]. Andere Serotypen werden nur selten isoliert, wie z.B. Serotypen der Spezies A. Einige findet man wiederum meist nur in besonderen Patientenkollektiven. So verhält es sich mit den höheren Serotypennummern, der Spezies D, welche fast ausschließlich bei AIDS-Kranken [18] und anderen Immunsupprimierten nachgewiesen wurden. Ebenfalls typisch für Infektionen bei Immunsupprimierten sind die Vertreter der Gruppe B2 unter denen z.B. der Serotyp 34 ist. Der einzige Serotyp der Spezies E gilt als typisches endemisch auftretendes Virus bei US-amerikanischen Rekruten [3]. Trotz der unterschiedlich häufigen Vorkommen der verschiedenen Serotypen wird davon ausgegangen, dass jeder Mensch im Leben mehrere Infektionen mit diesem Virus durchmacht und Antikörper gegen Adenoviren aufweist. Welche Serotypen hierfür verantwortlich sind, hängt überwiegend von der Immunitätslage innerhalb der jeweiligen Bevölkerung ab.

### **1.2.3. Virusaufbau**

Adenoviren sind unbehüllte Doppelstrang-DNA (dsDNA)-Viren mit einem ungefähren Durchmesser von 80 – 100 nm. Das Kapsid weist eine ikosaedrische Struktur auf und besteht aus 252 sogenannten Kapsomeren, 240 Hexonen und 12 Pentonen. Die Hexone bilden die Seitenflächen des Ikosaeders und sind wiederum ein Trimer des viralen Hexonproteins. Eine Seitenfläche besteht aus jeweils 12 Hexonen. Dabei sind jeweils 6 Hexone benachbart, wovon sich der Name dieser Struktur ableitet. Diverse weitere Strukturproteine sind mit den Hexonen sowohl auf der Kapsidaußen- als auch der Innenseite assoziiert. Die Ecken des Ikosaeders weisen fünf symmetrische Achsen auf und werden von den Pentonen gebildet, wodurch diese ihren Namen haben. Sie setzen sich aus zwei verschiedenen Proteinen zusammen, dem Pentonbasisprotein und den charakteristischen Fiberproteinen, welche antennenartig an den Kanten hervorstehen. Das Pentonbasisprotein besteht aus einem Fünffachkomplex des Strukturproteins III und ist mit jeweils 5 Hexonen verbunden. Das Fiberprotein ist ein

schaftartiges Homotrimer, dessen Länge 9 – 30 nm beträgt und an seinem Ende eine Knopfstruktur besitzt [3].

Im Kapsid ist die doppelsträngige lineare DNA enthalten, die zusammen mit verschiedenen Proteinen einen Nucleoproteinkomplex bildet. Die Proteine sind für die korrekte Verpackung und Faltung der DNA verantwortlich. Das Genom umfasst, abhängig vom Virustyp, zwischen 36000 und 38000 Basenpaare. An den 5'-Enden besitzt die DNA ein weiteres Protein, das terminale Protein (TP), welches über einen Serinrest mit der DNA verbunden ist. Durch eine Wechselwirkung der Proteine untereinander kommt es zu einem quasizirkulären Zustand des Genoms, was zur Genomorganisation beiträgt [3].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus des Adenovirus.** Adenoviren sind unbehüllte Viren, deren Kapside eine ikosaedrische Struktur aufweisen. Die Seitenflächen des Kapsids werden aus jeweils 12 Hexonen gebildet, welche mit diversen, weiteren Strukturproteinen an Innen- und außenseite assoziiert sind. Die Ecken des Ikosaeders bilden die Pentone, bestehend aus Pentonbasisprotein und Fiberprotein. Das Kapsid enthält doppelsträngige DNA, die mit verschiedenen Proteinen einen Nucleoproteinkomplex bildet und in einem quasizirkulären Zustand vorliegt.

Die Proteine, für die das virale Genom codiert, werden in fünf Gruppen eingeteilt und liegen im Genom benachbart vor. Man unterscheidet zwischen „Early-Proteinen 1-4“ und den „Late-Proteinen“. Die „Early-Proteine“ werden, wie der Name impliziert, im frühen Stadium der Infektion synthetisiert und übernehmen verschiedenste Funktionen, wie etwa die von Transkriptionsfaktoren oder Inhibitoren antiapoptotischer Proteine der Wirtszelle. Die Late-Proteine wiederum werden erst zum Schluss des Infektionszyklus exprimiert und umfassen die Menge der viralen Strukturproteine [3].

### 1.2.3.1. Hexon

Die Funktion innerhalb des Kapsids wurde bereits erläutert. Jedes Hexonprotein besteht dabei aus 966 Aminosäuren und wiegt 120 kDa [20]. 8% des viralen Genoms

wird für die Codierung dieser Polypeptidketten in Anspruch genommen. Innerhalb des Hexons kann zwischen konservierten Regionen, welche in allen Serotypen identisch sind, und hypervariablen Regionen unterschieden werden. Letztere liegen in den an den Außenflächen des Virions exponierten Loops und sind für die Serotyp-spezifische Immunogenität sowie für phänotypische Unterschiede im Kapsid verantwortlich [21]. Diverse hexonspezifische T-Zellepitope, sowohl für CD4+- als auch für CD8+-T-Zellen, konnten bisher nachgewiesen werden. Der größte Teil von ihnen befindet sich in der konservierten Region. Dabei konnte besonders bei MHC-II-Proteinen eine Reihe von Allelen nachgewiesen werden, durch die es zu einer Restriktion von Hexonepitopen kommt [22–24]. Die Lage der Epitope in der konservierten Region führte zur Hypothese der Kreuzreaktivität verschiedener Serotypen bezüglich der T-Zellantwort [25, 26].

#### **1.2.4. Infektionszyklus**

Adenoviren weisen ein breites Wirtsspektrum auf, befallen jedoch in der Regel Epithelzellen. Abhängig von der Virusspezies nutzen die Viren für den Vorgang der Adsorption verschiedene Rezeptoren. Die meisten Spezies der humanpathogenen Adenoviren nutzen primär die endständige, knöpfchenförmige Struktur des Fiberproteins, mit dessen Hilfe sie an den sogenannten CAR-Rezeptor (Coxsackie- und Adenovirusrezeptor) auf der Zelloberfläche binden [27]. Die Vertreter der Gruppen B und D nutzen andere Rezeptoren. So binden sich Serotypen der Spezies B über den CD46-Rezeptor an die Wirtszelle [28]. Doch auch CD80 und CD86, welche mit dem CD46 verwandt sind, dienen als Eintrittspforte. Im Falle der Spezies D werden vor allem Sialylsäuren [29, 30] als Rezeptoren genutzt. Zusätzlich gibt es noch einige weitere Mechanismen, die von einigen Serotypen verwendet werden, allerdings eine untergeordnete Rolle spielen. Im Zuge der Penetration kommt es zu einer zweiten Wechselwirkung zwischen Virus und Wirtszelle. Diese findet zwischen dem Pentonbasisprotein und den an der Zelloberfläche befindlichen Integrinen des Typs  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  [31] statt. Anschließend erfolgt die Internalisierung des Virus über eine Clathrin-vermittelte Endozytose. Das Virus gelangt in einem Endosom eingeschlossen in das Zytoplasma. Durch eine Ansäuerung des Endosoms kommt es zu dessen Zerstörung und damit zur Freisetzung des Viruspartikels unter Verlust der Pentone mitsamt der benachbarten Hexone. Entlang der zellulären Mikrotubuli gelangt der freie

Nucleoproteinkomplex in den Zellkern, wo im Anschluss die Transkription der „early-Proteine“ stattfindet, welche für die Replikation des Virusgenoms benötigt werden. Nach der semikonservativen Replikation werden die „Late-Proteine“ synthetisiert und es findet im letzten Schritt die Morphogenese statt. Hierfür entsteht zuerst ein Vorläufer des Kapsids aus den neu synthetisierten Hexonen und Pentonen. Darauf folgt die Einschleusung der genomassoziierten Proteine und erst im letzten Schritt gelangt die DNA in das Kapsid. Nach Fertigstellung des Virions erfolgt die Induktion der Apoptose durch das Virus, wodurch die Zelle abstirbt und das Virus freigesetzt wird [3].

### **1.2.5. Übertragung, Pathogenese und Immunreaktion**

Die Übertragung des Virus kann über verschiedene Wege erfolgen. So kann sowohl der direkte Kontakt, wie z.B. mit kontaminierten Materialien, als auch ein Schmierkontakt zu einer Infektion führen. Doch besonders bei den Serotypen, die Infekte im Respirationstrakt verursachen, erfolgt die Ansteckung durch Aerosole. Die Hälfte der Infektionen bleibt dabei asymptomatisch. Auch symptomatische Verläufe sind bei immunkompetenten Patienten in der Regel selbstlimitierend und nicht lebensbedrohlich. Häufig werden Schleimhäute der oberen und unteren Luftwege, des Gastrointestinaltrakts und der Konjunktiven befallen, welche auch die erste Eintrittspforte darstellen. Die Inkubationszeit hängt vom Serotyp ab und kann zwischen 2 und 8 Tagen betragen [32]. Nach dem Befall der Epithelzellen findet in diesen auch die Virusreplikation statt. Durch sie wird die eigene, zelluläre Proteinbiosynthese gehemmt, sodass die Wirtszelle in der Ausübung ihrer Funktion stark beeinträchtigt ist. Hierdurch und durch die lytische Zerstörung der Zelle kommt es zur Ausbildung der Symptomatik. Für die Bekämpfung der Infektion ist sowohl die native als auch die erworbene Immunantwort wichtig. In den befallenen Zellen kommt es in den Endosomen zur Aktivierung des „Toll-like-Rezeptors 9“, was zur Produktion von Klasse-I-Interferonen und anderer proinflammatorischer Substanzen führt [3]. Verschiedene Abwehrzellen, unter anderem Neutrophile, Makrophagen, Natürliche Killerzellen und Lymphozyten wandern in das betroffene Gewebe ein. Wie es bei viralen Erkrankungen meist der Fall ist, spielt hier besonders die zelluläre Immunantwort eine wichtige Rolle, wobei die genauen Mechanismen immer noch nicht vollständig erforscht sind. Sowohl CD-8+ T-Zellen als auch CD4+ sind für die Bekämpfung erforderlich [3].

Vermutlich spielen vor allem T<sub>H</sub>1-Zellen eine besondere Rolle [33, 34]. T-Zellepitope sind hierbei vor allem gegen Kapsidproteine und hierunter besonders gegen das Hexonprotein gerichtet. Doch auch verschiedene Proteine, welche von „early-Genen“ kodiert werden, können Ziel der T-Zellen sein. Gegen Adenoviren bleibt nach durchgemachter Infektion ein vermutlich lebenslanger virustypspezifischer Schutz, der jedoch mit steigendem Alter geringer zu werden zu scheint. Auch ist eine Kreuzreaktivität von adenoviruspezifischen T-Zellen immer wahrscheinlicher. Die B-Zellantwort richtet sich ebenfalls gegen Kapsidproteine. Die Antikörper, welche gegen die Knöpfchenstrukturen der Fiberproteine gerichtet sind, wirken hierbei neutralisierend und sorgen für einen lebenslangen Schutz der Patienten gegenüber dem jeweiligen Serotypen.

Jedoch verfügt das Virus auch über diverse Mechanismen, der Immunantwort zu entgehen. So sind einige Serotypen zum Beispiel in der Lage, MHC-Klasse-I-Antigene auf den befallenen Zellen zu reduzieren, wodurch sie der Erkennung durch CD8+-T-Zellen entgehen. Zudem wird vermutet, dass einige Serotypen, vor allem die der Spezies C, in lymphatischem Gewebe lebenslang persistieren können [35, 36]. Wahrscheinlich geschieht dies über eine Inhibition der interferonabhängigen Mechanismen der Zelle, virale DNA zu zerstören, vermittelt durch „early-Proteine“ und dem Einfluss von adenoviruspezifischer RNA.

### **1.2.6. Klinik**

Typische, von Adenoviren hervorgerufene Erkrankungen sind respiratorische Infekte, welche in der Regel eine Woche andauern. Besonders im Falle der Spezies B1 können diese Infektionen epidemisch auftreten und auch in Bronchitiden und Pneumonien übergehen. Gastrointestinale Infekte äußern sich mit Übelkeit und Erbrechen sowie Durchfällen, sind besonders bei Säuglingen und Kleinkindern anzutreffen und können bis zu zwei Wochen dauern. Bis zu 6 Wochen kann die durch Adenoviren verursachte Keratokonjunktivitis andauern. Selten kommt es auch zum Befall anderer Organe. Diese Art der Infekte hängt zumeist mit einer Einschränkung der Immunabwehr zusammen. So wird die hämorrhagische Zystitis, welche meist von Serotypen der Spezies B2 verursacht wird, besonders bei immundefizienten Patienten beobachtet. Nephritiden kommen vor allem bei Nierentransplantierten vor. Auch wurden schon Meningoencephalitiden sowie Hepatitiden beschrieben. Besonders

gefürchtet ist die disseminierte Adenovirusinfektion, die bisweilen bei Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation auftreten kann und insbesondere bei Kindern häufig einen letalen Ausgang nimmt [32].

### **1.2.7. Diagnostik und Therapie**

Für den Nachweis kann das Adenovirus, abhängig von der Erkrankung, aus verschiedenen Körperflüssigkeiten isoliert werden. Als Goldstandard gilt zwar die Virusisolierung in der Zellkultur, jedoch ist diese Methode sehr zeitaufwendig, sodass heutzutage der Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgt. Mit dieser kann sowohl die Viruslast bestimmt werden als auch die Typisierung erfolgen, welche besonders zur Beantwortung epidemiologischer Fragen von Belang sein kann. Der Nachweis von Adenoviren im Stuhl oder im Urin kann auch elektronenmikroskopisch erbracht werden. Zudem sind Schnelltests zum Antigennachweis mittels ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) vorhanden, werden jedoch nur selten eingesetzt. Auch der Immunfluoreszenztest, welcher insbesondere bei Abstrichmaterialien verwendet wird, wird in der Regel noch mit einem zweiten Nachweisverfahren kombiniert. Serologische Verfahren spielen in der Diagnostik von Adenoviren nur eine untergeordnete Rolle.

Bisher gibt es keine etablierte antivirale Therapie zur Bekämpfung einer Adenovirusinfektion. Cidofovir und Ribavirin werden bei Immunsupprimierten als „Orphan-Drugs“ verwendet, jedoch nur mit mäßigem Erfolg. Ganciclovir und Dideoxycytidin konnten in vitro einen Rückgang der Viruslast erzielen. Allerdings liegt die benötigte Dosis dieser Medikamente in vivo zu hoch und ist somit in der Klinik nicht einsetzbar.

Zur Vermeidung epidemischer Ausbrüche ist es bei Auftreten von Adenovirusinfektionen besonders in Gemeinschaftseinrichtungen wichtig, die richtigen Hygienemaßnahmen zu ergreifen. So weist das Virus eine hohe Tenazität gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen auf, sodass speziell viruzide Desinfektionsmittel anzuwenden sind [32].



### **1.3. Herpesviren**

#### **1.3.1. Einteilung**

In der Familie der Herpesviren sind acht humane Vertreter bekannt, die in drei Untergruppen eingeteilt werden. Die Einteilung erfolgt hierbei nach Pathogenität, Zelltropismus und ihren Replikationseigenschaften. Die Untergruppen werden  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Herpesviren genannt. Sowohl Herpes-simplex-Virus 1 als auch das Varizella-Zoster-Virus (VZV) gehören zur ersten Gruppe. Diese zeichnet sich durch einen breiten Zelltropismus aus, sowie durch die Persistenz, also der lebenslangen latenten Infektion in Ganglienzellen. Das HSV-1 gehört der Gattung der Simplexviren an, welche neben dem HSV-1 auch das HSV-2 als humanes Virus beinhaltet. Das VZV ist das einzige Virus der Gattung Varicellovirus, welches den Menschen als Erregerreservoir besitzt.

#### **1.3.2. Epidemiologie**

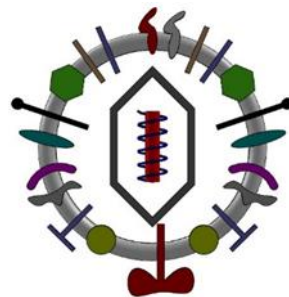
Das HSV-1 ist weltweit endemisch, wobei die Seroprävalenz vom Kleinkindalter an stetig zunimmt. Die Primärinfektion findet meist im Alter zwischen 1 und 4 Jahren statt. HSV-1-Infektionen sind unabhängig von der Jahreszeit. Im Erwachsenenalter liegt die Durchseuchungsrate in Deutschland bei circa 90% [37].

Auch das VZV ist weltweit anzutreffen, wobei die altersabhängige Seroprävalenz geographische Unterschiede aufweist. In gemäßigten Klimazonen werden die meisten Primärinfektionen vor dem 10. Lebensjahr durchgemacht [38, 39], während sie in tropischen Zonen erst später auftreten. In Deutschland beträgt die Durchseuchungsrate im Kleinkindalter etwa 7% und liegt bei Jugendlichen bereits bei 95%. Mit 40 Jahren liegt die Seroprävalenz dann bei knapp 100%. Im Gegensatz zum HSV-1 weist das VZV jahreszeitabhängige Erkrankungsgipfel auf, welche im Winter und Frühjahr liegen.

#### **1.3.3. Virusaufbau**

Der Aufbau der Viruspartikel ist bei allen Vertretern der humanen Herpesviren ähnlich. Die Größe des Partikels beträgt im Falle des HSV-1 100-110 nm, das VZV ist mit 150-200 nm etwas größer. Die Virionen bestehen allesamt aus einem ikosaedrischen Kapsid mit einem ungefähren Durchmesser von 90–100 nm, das die lineare

Doppelstrang-DNA enthält und von einem Tegument und einer Hüllmembran umgeben ist. Die Membran stammt von den Wirtszellen und weist diverse eingelagerte Proteine auf, von denen ein großer Teil glycosiliert ist. Die Zahl dieser Proteine variiert zwischen den verschiedenen Typen. Sie werden mit einem kleinen g und einem weiteren Großbuchstaben gekennzeichnet (z.B. gB, gC etc.). Diese Hüllproteine besitzen verschiedene, wichtige Funktionen beim Infektionszyklus und stellen zudem wichtige Antigene bei der Bildung einer effektiven Immunantwort dar. Zwischen Hüllmembran und Kapsid liegt das Tegument, ein Komplex nicht strukturierter Proteine, welcher verschiedene regulatorische Funktionen übernimmt. Allerdings sind sie noch nicht in voller Gänze geklärt. Das darunterliegende Kapsid besteht aus 162 Kapsomeren, die aus dem Kapsidprotein VP5 bestehen. Sechs dieser Proteine bilden hierbei ein Kapsomer. Diese sind mit weiteren Strukturproteinen verbunden. 12 p155-Proteine, sogenannte Pentone, sitzen an den Ecken des Ikosaeders, an welche Vertex-Proteine gebunden sind. Über das VP23-Protein sind die Kapsomere an der Innenseite mit der DNA assoziiert. Im Inneren des Kapsids sitzt das Virusgenom, das eine fibrilläre Proteinmatrix umgibt, das sogenannte Virus-Core [3]. Die Genomlänge wie auch die Partikelgröße unterscheiden sich unter den einzelnen Virustypen. Das Genom des HSV-1 umfasst 152 000 Basenpaare, das des VZV ist mit circa 125 000 das kleinste der humanen Herpesviren [3].



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Herpes-Simplex Virus.** Herpesviren sind behüllte Viren, deren Hüllmembran von Wirtszellen stammt, in die verschiedene virale Hüllproteine eingelagert sind. Unter der Hüllmembran befindet sich das sogenannte Tegument, bestehend aus einem Komplex nicht strukturierter Proteine. Hüllmembran und Tegument umgeben das virale Kapsid, welches eine ikosaedrische Form aufweist und aus dem Kapsidprotein VP5 besteht. Die Ecken werden von p155-Proteinen gebildet. Das Virusgenom im Inneren des Kapsids liegt als lineare ds-DNA vor, das eine fibrilläre Proteinmatrix, das Virus-Core umgibt.

### **1.3.4. Virusproteine**

Die durch das HSV-1 und das VZV kodierten Proteine werden weiterhin unterteilt in Struktur- und Nichtstrukturproteine.

Ein wichtiger Teil der Strukturproteine sind die glycosilierten Proteine der Hüllmembran. Einige von ihnen sind hierbei konserviert und bei allen Vertretern anzutreffen, andere wiederum sind virusspezifisch. Das HSV-1 verfügt über 12 dieser Membranproteine, nämlich gB-gN. Das VZV weist neun Glykoproteine auf, gB, gE, gH, gI, gK, gL und gM sowie ein weiteres, das ORF-1-Protein, welches nur von VZV codiert wird [40]. Dessen Funktion ist noch nicht vollständig geklärt. Der Komplex aus gH und gL, bei HSV-1 zusätzlich auch der gB/gD-Komplex, vermittelt die Internalisierung des Virions in die Zelle [41]. Das gC-Protein findet sich auch auf infizierten Zellen und ist in der Lage, den Komplementfaktor C3b zu binden, wodurch vermutlich die komplementvermittelte Elimination verhindert wird. Durch die Glykoproteine gE und gI besteht ein weiterer Mechanismus, der Immunantwort zu entgehen. Durch Bildung eines heterodimeren Komplexes binden diese Proteine  $\gamma$ -Ketten der Immunglobuline, indem sie als Fc-Rezeptoren fungieren. Somit werden die Antikörper an der Interaktion mit den Effektorzellen gehindert. Des Weiteren wird vermutet, dass es durch die Bindung der Antikörper zu einer Maskierung der B-Zellepitope kommt und die Zellen so der Immunantwort entgehen können [42]. Unabhängig von diesem Mechanismus vermitteln diese Glykoproteine die Weitergabe der Virionen an die benachbarten Zellen. Weitere Strukturproteine stellen die Tegumentproteine dar. Sie besitzen verschiedene Aufgaben, sind aber besonders als Aktivatoren zuständig, für die Hemmung von Prozessen, die für die Immunabwehr wichtig sind oder für die Zerstörung zelleigener DNA und somit für den Zellarrest [3].

Neben den Strukturproteinen kodiert das Virusgenom außerdem für Proteine, die für die Genomreplikation notwendig sind. Hierzu gehören Proteine wie die virale DNA-Polymerase, der Helicase-Primase-Komplex oder die Thymidinkinase [3].

### **1.3.5. Infektionszyklus und Replikation**

Die Adsorption beider Viren erfolgt mittels gB, welches an Heparansulfat-Proteoglycane [43] auf der Zelloberfläche bindet. Das VZV bindet mit Mannose-6-Phosphat-Einheiten zusätzlich an Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren [44]. Eine zweite

Kontaktaufnahme erfolgt im Falle des HSV-1 mit Hilfe des gD-Proteins, das mit Nectin-1 und HVEM auf der Zelloberfläche interagiert [45]. Nach der Adsorption erfolgt die Internalisierung, indem die Virusmembran mit der Zellmembran verschmilzt. Zudem scheint es auch einen zweiten Weg über rezeptorvermittelte Endozytose zu geben, bei dem die Freisetzung des Kapsids in das Zytoplasma nach pH-abhängiger Fusion des Virus- mit der Endosomenmembran erfolgt [46]. Auch eine zellgebundene Virusverbreitung ist möglich, während der es zur Membranverschmelzung von infizierten Zellen mit entsprechendem Proteinmuster auf der Zelloberfläche mit nicht infizierten Zellen kommt [47]. Anschließend gelangt das nun unbehüllte Virion in das Zytoplasma, wo es entlang der Mikrotubuli zum Kern transportiert wird. Das Genom gelangt so, zusammen mit weiteren viralen Proteinen in das Nucleoplasma. Im Zellkern kommt es zur Zirkularisierung des Virusgenoms, welches dann als Episom unabhängig vom Wirtsgenom vorliegt [48]. Vor der Replikation des Virusgenoms kommt es zur Expression von „Immediate early“- und „Delayed early“-Proteinen, welche als Aktivatoren und für die Replikation notwendigen Enzyme fungieren. Die DNA-Synthese beginnt an einer bestimmten Sequenz, „Ori<sub>lyt</sub>“ genannt. Während der Synthese kommt es gleichzeitig zur Expression der „Late-Proteine“. Die Glykoproteine werden hierbei im endoplasmatischen Retikulum gebildet und werden über den Golgi-Apparat, an welchem diverse Modifizierungen stattfinden, an die Zelloberfläche transportiert. Die Synthese der Kapsidproteine findet im Zytoplasma statt. Anschließend werden sie in den Zellkern transportiert und dort gemeinsam mit der viralen DNA zu einem Virusvorläufer zusammengesetzt. Durch Anlagerung an die innere Kernmembran und anschließender Knospung gelangt das Viruspartikel in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Durch Fusion mit dessen Membran entsteht ein unbehülltes Virion, welches in das Zytoplasma freigesetzt wird. In einem nächsten Schritt lagert sich das Kapsid an die Tegumentproteine an, die sich am Golgi-Netzwerk befinden, ebenso wie die Glykoproteine. Das Virion wird von dessen Membran umhüllt und so sowohl mit Tegumentproteinen als auch mit einer mit Glykoproteinen besetzten Membran versehen. Wiederum durch Knospung verlässt das Virus daraufhin die Zelle [3]. Auch eine Weitergabe tegumenthaltiger Nucleocapside über Zell-Zell-Kontakte ist möglich [49].

Während der Latenzzeit liegt das Virusgenom als extrachromosomales Episom vor, das mit dem Wirtsgenom assoziiert ist und ebenfalls von der zellulären DNA-Polymerase repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben wird. Im Falle der  $\alpha$ -

Herpesviren können in einer Zelle zwischen 10 und 100 Episome vorliegen. Die genauen Mechanismen, wie die Latenz aufrechterhalten wird und wie es zu einer Reaktivierung des Virus kommt, ist noch nicht ausreichend geklärt. Im Falle des HSV-1 spielt sogenannte „LAT-RNA“ eine Rolle. Dies ist RNA, die ausschließlich in der Latenzphase transkribiert wird und im Sinne der RNA-Interferenz für die Unterdrückung der Expression von „early“-Proteinen zuständig ist. Das VZV scheint den Latenzmechanismus über die eingeschränkte Expression von Virusgenen aufrechtzuerhalten [50, 51].

### **1.3.6. Übertragung, Pathogenese und Immunreaktion**

#### **1.3.6.1. HSV-1**

Die Übertragung erfolgt meist direkt durch Speichel oder durch den infektiösen Bläscheninhalt aktiver Primärinfektionen. Aber auch Schmierinfektionen sind möglich. Kleinste Schleimhautläsionen dienen hierbei als Eintrittspforte.

Nach Eintritt der Viren in die Schleimhautzellen kommt es dort zur lytischen Vermehrung in diesen. Die befallenen Zellen fusionieren nach deren Degeneration zu vielkernigen Riesenzellen. Es kommt zu einer Nekrose des Epithels mit dem klinischen Bild der ulzerativen Vesikel. Die Basalmembran wird hierbei jedoch nicht durchbrochen. Während dieser Phase nutzen die Viren zudem die das Epithel versorgenden sensorischen Nervenendigungen über Zell-Zell-Kontakte, um über diese retrograd entlang der Axone in die Ganglien zu gelangen. Hier findet die latente Infektion statt, wodurch die Viren in der Lage sind, lebenslang im Wirt zu persistieren [32]. Im Falle einer oro-facialen Infektion findet dieser Vorgang im Trigeminalganglion statt, im selteneren Fall eines anogenitalen Befalls persistiert das HSV-1 in den Lumbosakralganglien [52]. Während der Latenzphase liegt die Virus-DNA in episomaler Form vor. Im Zuge der Reaktivierung kommt es zur Bildung tegumenthaltiger Nucleocapside, welche anterograd entlang der Axone in die Haut gelangen und dort die beschriebenen Symptome auslösen.

Während der Primärinfektion kommt es zu Beginn zur Einwanderung von Granulozyten in das betroffene Gewebe. Zudem kommt es zu einer Ansammlung von CD4+-T-Zellen in der Dermis, welche INF- $\gamma$  sezernieren und somit zur Makrophagenaktivierung führen. Gleichzeitig kommt es zu einer Aufnahme des Virus durch Langerhans-Zellen, die daraufhin das infizierte Gewebe verlassen und in die

Lymphknoten wandern. Dort präsentieren sie als reife, dendritische Zellen den Lymphozyten das Virus als Antigen. Die Antikörperantwort spielt bei der Bekämpfung der Virämie eine wichtige Rolle. Während zu Beginn besonders Antikörper gegen Nichtstrukturproteine gebildet werden, sind im weiteren Verlauf vor allem neutralisierende Antikörper gegen Glykoproteine nachzuweisen [3]. Auch der Großteil der T-Zellepitope richtet sich gegen Glykoproteine, vorzugsweise gB und gD [53–55]. Neben diesen findet eine Antigenerkennung durch weitere Strukturproteine wie den „VP“-Proteinen oder durch „Immediate early“-Proteine statt [56–58]. Und auch dieser Arm der Immunantwort ist bei der Bekämpfung einer Primärinfektion von großer Relevanz [59, 60]. Hier sind besonders CD8+-T-Zellen für die Eindämmung von Hautläsionen verantwortlich [61]. Zudem scheint ihr eine wichtige Rolle in der Verhinderung von Rezidivinfektionen, wie auch in der Bekämpfung von Rekrudeszenzen zuzukommen. So werden CD4+- und besonders CD8+-T-Zellen in Neuronen nachgewiesen, die verschiedene Zytokine und Mediatoren freisetzen, wie etwa INF- $\gamma$  und IL-10 und so zur Aufrechterhaltung des Latenzzustandes beitragen [8, 62, 63].

#### **1.3.6.2. VZV**

Das VZV gilt als hoch kontagiös und wird vor allem aerogen übertragen. Ansteckend sind hierbei der Speichel und die Konjunktivalflüssigkeit von akut Erkrankten und Infizierten kurz vor Erscheinen des Exanthems. Auch die Bläschenflüssigkeit ist höchst ansteckend, sowohl während der Primär- als auch während der Sekundärinfektion. Jedoch ist das Ansteckungsrisiko durch Zoster-Patienten niedriger, da es hier zu keiner Virämie kommt und somit nur der Bläscheninhalt kontagiös ist. Der Kontagiositätsindex<sup>1</sup> liegt bei knapp 1,0, sodass eine Primärinfektion mit VZV bei 90% der Exponierten zu einer apparenten Infektion führt [32]. Im Zuge der Primärinfektion kommt es zum Befall der Schleimhäute des oberen Respirationstrakts, aus welchem es im Anschluss das lokale lymphatische Gewebe infiltriert und sich dort vermehrt. Hier infiziert das Virus periphere mononukleäre Blutzellen, durch die es in die Blutbahn gelangt und so die erste virämische Phase auslöst, welche nach einer Inkubationszeit

---

<sup>1</sup> Maß für den Anteil der nicht-immunen Population, bei dem der Kontakt mit einem pathogenen Erreger zu einer Infektion durch diesen führt

von 4-6 Tagen stattfindet. Die zweite virämische Phase tritt 10-14 Tage post infectionem (p.i.) ein und ist durch die Infektion der Epithelzellen gekennzeichnet, durch die es zu einer lokalen Entzündungsreaktion gekennzeichnet [32]. Es kommt zur Einwanderung spezifischer Immunzellen, die neben anderen Zytokinen INF- $\gamma$  freisetzen [64]. Die hierdurch abgegebene Gewebeflüssigkeit bewirkt die Bildung der Bläschen, welche zellfreie Viruspartikel und später auch verschiedene Immunzellen enthalten. Wie auch beim HSV-1 fusionieren die infizierten Zellen unter Bildung vielkerniger Riesenzellen. Über Zell-Zellkontakte wandert das Virus während der Infektion retrograd entlang der Axone sensorischer Nervenfasern und verbleibt lebenslang in den Spinal- und den Hirnnervenganglien. Zu einer Rezidivinfektion kann es, analog zum HSV-1 unter anderem durch Stress, Immunsuppression und Medikamente kommen [65]. Hierbei vermehrt sich das Virus in den Ganglien, wobei diese zum Teil stark beschädigt werden können. Anschließend gelangen die Viren anterograd entlang der Axone in die Epithelzellen der entsprechenden Neurone und verursachen hier das Exanthem [32].

Die Antikörperantwort richtet sich bei der Primärinfektion gegen verschiedene Glykoproteine. Diese sind meist neutralisierend und schützen vor Neuinfektionen. Rezidivinfektionen andererseits können durch sie nicht verhindert werden. Die T-Zellantwort spielt sowohl während der Primärinfektion als auch bei der Reaktivierung eine wichtige Rolle. So werden schon im frühen Stadium der Primärinfektion CD4+- und CD8+-T-Zellen nachgewiesen, die für die Eliminierung virusbefallener Zellen zuständig sind [66]. Die spezifische Antwort beider Subpopulationen richtet sich hierbei gegen diverse Glykoproteine, unter anderem der Typen B, E und D. Aber auch „Immediate-early“ Proteine stellen Epitope der T-Zellrezeptoren dar. Hierzu gehören IE 62 und 63 [67–72]. Sowohl die humorale als auch die T-Zellvermittelte Immunantwort sinkt mit zunehmendem Alter, sodass Rezidivinfektionen gehäuft bei älteren Patienten auftreten. Nach Reaktivierung steigen beide jedoch wieder an.

### **1.3.7. Klinik**

#### **1.3.7.1. HSV-1**

Bezüglich der Klinik wird zwischen einer Primär- und einer Rezidivinfektion unterschieden. Beide manifestieren sich im Falle des HSV-1 in der Regel im orofacialen Bereich. Seltener können auch Infektionen im Genitalbereich stattfinden,

wobei die Übertragung hier durch Sexualkontakt erfolgt. Die Primärinfektion verläuft oft asymptomatisch. Bei symptomatischen Verläufen kann es zu einem unspezifischen Fieberinfekt kommen oder nach einer Inkubationsphase von etwa 3 bis 6 Tagen zu schmerzhaften ulzerativen Vesikeln der Mund- und Rachenschleimhaut, der sogenannten Gingivostomatitis aphtosa. In der Regel wird dies begleitet von Fieber, Lymphknotenschwellung und Konjunktivitis. Zu diesem Zeitpunkt ist der Patient virämisch. Die Symptomatik dauert etwa 2 bis 3 Wochen und verläuft in der Regel ohne Komplikationen. Jedoch kann in seltenen Fällen eine HSV-Enzephalitis auftreten. Eine weitere gefürchtete Komplikation ist der Herpes neonatorum, eine Übertragung des Virus auf Neugeborene, bei dem es zu einer generalisierten Erkrankung mit ZNS- und Organbeteiligung kommt und die trotz Therapie ein schlechtes „Outcome“ hat. Bei der Rezidivinfektion wird zwischen der asymptomatischen Form, der Rekurrenz und der symptomatischen, der sogenannten Rekrudeszenz unterschieden. Diese zeigt sich in Form eines Herpes labialis, einem vesikulären, ulzerativen Exanthem [3]. Die Reaktivierung ist hierbei durch verschiedene Einflüsse möglich, so zum Beispiel durch Stress, UV-Licht, Hitze usw. [73]. Komplikationen der Rezidivinfektion sind das Ekzema herpeticum, ein großflächiges Ekzem, welches meist auf dem Boden einer bereits bestehenden Hauterkrankung entsteht und mit dem Risiko einer generalisierten HSV-1-Infektion verbunden ist. Ein weiteres Krankheitsbild ist der Herpes corneae, ein Übergreifen der Infektion auf das Auge, das in schweren Fällen auch zum Verlust der Sehkraft führen kann. Besondere Vorsicht ist bei Immunsupprimierten geboten. Hier kann es zu einem zu schweren, ausgedehnten Verläufen der ulzerativen Hautläsionen kommen. Des Weiteren sind hier lebensbedrohliche generalisierte Infektionen mit Enzephalitiden, Pneumonien und weiteren befallenen Organen gefürchtet, da sie eine hohe Mortalitätsrate aufweisen [74–76].

### **1.3.7.2. VZV**

Das VZV nutzt während der Primärinfektion die Schleimhäute des Oro- und Hypopharynx als Eintrittspforte und löst nach einer Inkubationszeit von etwa 14 Tagen das klinische Bild der Windpocken aus. Ein Prodromalstadium tritt hierbei nicht auf. Die Krankheit beginnt mit Fieber und einem vesikulären Exanthem, welches sich von der Mundschleimhaut, dem Kopf und dem Rumpf auf die Extremitäten ausbreitet, wobei Handflächen und Fußsohlen meist nicht betroffen sind. Zu Beginn erscheinen



die Effloreszenzen als linsengroße rote Flecken, welche sich im weiteren Verlauf zu Papeln, Bläschen, gelblichen Pusteln und schlussendlich zu Krusten weiterbilden. Die Bildung des Hautausschlags verläuft in Schüben und dauert etwa 4-5 Tage, wodurch verschiedene Stadien des Ausschlags gleichzeitig anzutreffen sind. Dieses typische Bild eines „Sternenhimmels“ ist wichtig für die Differenzialdiagnostik. Im Regelfall klingt der Ausschlag nach etwa 2 Wochen ohne Narbenbildung ab. Komplikationen kommen bei Immungesunden hierbei nur selten vor. Kinder unter einem Jahr und Jugendliche über 16 Jahren weisen die höchste Rate an Komplikationen auf, welche sich in bakteriellen Superinfektionen, Encephalitiden, Pneumonien und Thrombozytopenien äußern [77]. Immunsupprimierte wiederum stellen eine Risikogruppe dar, bei welchen diese Komplikationen deutlich häufiger anzutreffen sind. Ein weiteres gefürchtetes Krankheitsbild ist das Varizellensyndrom, welches durch die transplazentare Übertragung der Schwangeren auf den Fetus auftreten kann [78]. Infektionen in der Frühphase der Schwangerschaft weisen eine Letalität von 30% auf. Tritt die Primärinfektion perinatal auf, liegt sie bei 20%. Auch Schwangere selbst weisen einen schwereren Verlauf auf, mit manchmal tödlich verlaufenden Pneumonien.

Eine besondere Form der Primärinfektion sind die Durchbruchsvarizellen, welche in Folge einer Impfung auftreten können und durch das Wildvirus ausgelöst werden. Der Verlauf ist in diesem Fall jedoch weitaus milder. In der Regel tritt es erst etwa 5 Wochen nach Impfung auf und zeichnet sich durch einige wenige Effloreszenzen aus, die nicht alle Stadien der Windpocken durchlaufen und für weniger kontagiös gehalten werden. Auch Komplikationen werden nur selten beobachtet.

Wie das HSV-1 verbleibt auch das VZV lebenslang im Wirt und ist in der Lage, in Form eines Herpes Zoster zu rezidivieren. Diesem geht eine Prodromalphase mit Allgemeinsymptomen von 2-5 Tagen Dauer voraus. Charakteristisch ist hierbei ein auf wenige Dermatome beschränkter Schmerz, der auch von Sensibilitätsstörungen begleitet werden kann. Im Folgenden tritt in diesem Areal ein Erythem auf, welches sich ähnlich wie die Varizellen über einige Tage in Papeln und Bläschen entwickelt. Häufig wird das Exanthem von Fieber begleitet. Die Symptome klingen bei Immungesunden nach etwa 2 Wochen ab. Gerade bei älteren Patienten können an der betroffenen Stelle starke, andauernde Schmerzen auftreten, sogenannte postzosterische Neuralgien. In manchen Fällen kann es auch zu einer Beteiligung der Hirnnerven und dadurch des Auges oder des Ohres kommen, was als Zoster ophthalmicus, bzw. Zoster oticus bezeichnet wird [79]. Die Verläufe bei

Immunsupprimierten sind häufig schwerer und können in eine generalisierte Infektion oder chronische Form des Zosters übergehen [3, 32].

### **1.3.8. Diagnostik und Therapie**

#### **1.3.8.1. HSV-1**

Zum Nachweis von HSV-1 können verschiedene Verfahren angewendet werden. Als Goldstandard gilt die Virusanzucht, welche aufgrund der guten Anzüchtbarkeit des Virus leicht durchzuführen ist. Jedoch setzt dies einen schnellen Probentransport voraus, da das HSV-1 als behülltes Virus recht umweltlabil ist. Aufgrund dessen und aufgrund der schnellen Verfügbarkeit wird heute zumeist das PCR-Verfahren der Virusanzucht vorgezogen. Zum Nachweis von Antikörpern werden ELISA-Tests durchgeführt.

Für die Therapie einer HSV-1-Infektion stehen verschiedene Therapeutika zur Verfügung. Als Standardmedikament ist Aciclovir zugelassen. Zudem gibt es Valaciclovir, Penciclovir, Famciclovir, Trifluridin und Foscarnet. Die Therapie kann je nach Ausmaß der Erkrankung lokal, oral oder auch intravenös appliziert werden, wobei letzteres nur bei schweren generalisierten Verläufen angewendet wird [32].

#### **1.3.8.2. VZV**

Zum Nachweis einer VZV-Infektion stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Methode der Wahl ist hierbei die PCR. Zur Kontrolle des Serostatus oder zum Nachweis von Antikörpern im Liquor kann ein ELISA durchgeführt werden. Während komplikationslos verlaufende Windpocken rein symptomatisch behandelt werden, wird beim Auftreten einer Primärinfektion bei Angehörigen einer Risikogruppe eine intravenöse Therapie mit Aciclovir eingeleitet. Zur Behandlung des Zosters sind verschiedene Virostatika zugelassen: Aciclovir, Brivudin, Famciclovir und Valaciclovir. Besonders bei Immunsupprimierten sollte eine antivirale Therapie durchgeführt werden. Entsprechend der Stiko-Empfehlung ist die Varizellenimpfung in Form einer attenuierten Lebendimpfung des Stammes Oka als Standardimpfung für Kinder zwischen dem 11. und 14. Lebensmonat vorgesehen. Auch Patienten mit Risikoanamnese, wie zum Beispiel seronegative Frauen mit Kinderwunsch oder seronegative Patienten mit bevorstehender Immunsuppression, sollten geimpft

werden. Des Weiteren ist eine passive Prophylaxe mit Immunglobulinen verfügbar, die innerhalb 3-4 Tagen p.i. gegeben werden kann. Der Impfstamm wurde 1976 erstmals entdeckt und beschrieben [80]. Eine effiziente Stimulation der virusspezifischen T-Zellantwort [81] als auch eine deutliche Boosterwirkung konnten bereits gezeigt werden. So kommt es zur Stimulation von  $T_{cm}$  und  $T_{em}$  beider Subpopulationen mit einer verstärkten Sekretion von INF- $\gamma$  [82].

#### **1.4. ELISpot**

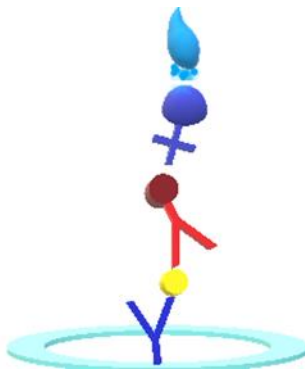
Das Prinzip des ELISpots (Enzyme-Linked-Immunospot-Assay) ist bereits seit den 80er Jahren bekannt. Verschiedene enzymgekoppelte Immunoassays wurden zu dieser Zeit bereits durchgeführt [83, 84]. Der ELISpot (Enzyme-Linked-Immunospot-Assay) in seiner heutigen Form wurde von Gessner et al. entwickelt und kommt in verschiedenen Bereichen der Forschung und Diagnostik zur Anwendung [85]. Vorrangig wird er für die Tuberkulosedagnostik zur Überprüfung eines stattgefundenen Antigenkontakts, besonders vor Einleitung einer immunsuppressiven Therapie, genutzt [86, 87].

Wie der Name dieses Testverfahrens impliziert, handelt es sich hierbei um ein enzymgekoppeltes Verfahren unter Nutzung von spezifischen, monoklonalen Antikörpern. Es ermöglicht die Detektion von sezernierten Analyten durch stimulierte Zellen und hierdurch wiederum indirekt die Detektion der Zelle.

In einem ersten Schritt findet bei diesem Verfahren das sogenannte „Coating“ statt, also die Beschichtung und Immobilisierung der Vertiefungen mit dem Primärantikörper. Dieser besitzt an der Fab-Region eine spezifische Bindungsstelle für das nachzuweisende Analyt. Im Anschluss erfolgt die Zugabe der Zellen zusammen mit dem gesuchten Stimulus. Erkennen die T-Zellen den spezifischen Stimulus, kommt es zu einer Immunantwort in Form einer Zytokinausschüttung durch die Immunzellen. Entsprechend der Bindungsspezifität des Primärantikörpers können bestimmte Subpopulationen aus dem Zellpool nachgewiesen werden [88, 89]. Bei Sekretion des gesuchten Zytokins bindet dies an die Fab-Region des Primärantikörpers. In einem nächsten Schritt wird nun der Sekundärantikörper hinzugegeben. Dieser besitzt ebenfalls eine spezifische Bindungsstelle für das Analyt, bindet jedoch an ein anderes Epitop als der Primärantikörper. In der Regel ist der Sekundärantikörper

biotinkgekoppelt. Durch Zugabe eines Streptavidin-Enzym-Konjugats wird dieser zur Sichtbarmachung der Reaktionskette genutzt. Streptavidin ist ein Protein, welches von dem Bakterium *Streptomyces avidinii* produziert wird und eine sehr hohe Affinität zu Biotin besitzt. Es kommt somit zur Bindung durch das Streptavidin an das Biotin.

Im letzten Schritt erfolgt die Zugabe eines präzipitierenden Farbstoffs, der mit dem an das Streptavidin gekoppelten Reporterenzym reagiert. Das Farbstoffsubstrat wird vom Enzym umgesetzt und es kommt zu einer Ausfällung des Substrats an der Sekretionsstelle. Es bildet sich ein Spot, der einer sezernierenden T-Zelle entspricht. Das Testverfahren weist eine hohe Sensitivität und Spezifität auf. So ist es möglich, eine reaktive Zelle aus 100.000 PBMC zu detektieren.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des ELISpot-Assays.**

Zunächst wird die Platte mit einem Primärantikörper „gecoatet“, welcher eine spezifische Bindungsstelle für das nachzuweisende Analyt, z.B. INF- $\gamma$ , aufweist. Anschließend werden T-Zellen gemeinsam mit einem Antigen inkubiert. Kommt es zu einer Immunantwort der T-Zellen durch das Antigen, folgt eine Zytokinausschüttung durch diese. Bei Sekretion des gesuchten Zytokins, bindet dieses an die Fab-Region des Primärantikörpers. Anschließend wird ein biotinkgekoppelter Sekundärantikörper hinzugegeben, der das Analyt ebenfalls spezifisch bindet. Danach erfolgt die Zugabe eines Streptavidin-Enzym-Konjugats, welches über Streptavidin an das Biotin bindet. Zum Schluss wird ein präzipitierendes Farbstoffsubstrat hinzugegeben, welches durch das gekoppelte Enzym umgesetzt wird und zu einer Ausfällung des Substrats führt, wodurch die charakteristischen Spots auf der Platte entstehen und einer reaktiven T-Zelle entsprechen.

## 1.5. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieses Forschungsprojekts ist die Entwicklung eines neuen diagnostischen Markers, mit dessen Hilfe die zelluläre Immunkompetenz bezüglich der oben genannten Viren gemessen werden kann. Das Projekt umfasst hierfür vier Meilensteine: Die Virusanzucht in FKS (Fetales Kälberserum)-freiem Medium,

Virustitration, Virusinaktivierung und die anschließende Studie der T-Zellmessung mittels dem hoch sensitiven ELISpot-Verfahren an 19 Probanden. Die Anzucht der Viren in einem FKS-freien Medium ist von Interesse, da in FKS eine Vielzahl von Proteinen enthalten ist, die zu einer unspezifischen T-Zellaktivierung im ELISpot führen und damit das Ergebnis verfälschen könnten. Die von den Probanden erhaltenen peripheren mononukleären Zellen (PBMC), welche durch eine Blutentnahme gewonnen werden, werden in dem Verfahren mit einem Antigen stimuliert. Anschließend wird die Zahl INF- $\gamma$  sezernierender, also reaktiver T-Zellen quantifiziert. Die Antigene stellen zum einen die verschiedenen eigens angezüchteten Viren dar. Zu den verschiedenen Serotypen der Adenoviren werden jedoch zusätzlich zwei rekombinant hergestellte Virusproteine eingesetzt, die käuflich erworben wurden. So soll bezüglich des Adenovirus nicht nur die Durchführbarkeit des ELISpots überprüft werden, sondern auch das Adenovirus als Gesamtantigen den rekombinanten Proteinen gegenübergestellt werden und somit geprüft werden, ob eines dem anderen im ELISpot überlegen ist. Ziel des Projekts ist es zudem, zu untersuchen, inwiefern die gemessene T-Zellantwort mit dem Antikörpertiter im untersuchten Gewebe korreliert und einen eventuellen Vorteil der einen gegenüber der anderen Nachweismethode zu finden.

Adenovirusinfektionen zeigen in der Regel einen milden Verlauf und Immungesunde werden nur selten schwer durch sie beeinträchtigt. Jedoch sind sie bis heute auch für eine Vielzahl von zum Teil lebensbedrohlichen Krankheitsbildern verantwortlich, wovon besonders spezielle Risikogruppen betroffen sind. So stellen Infektionen mit Adenoviren für Immunsupprimierte, insbesondere für Stammzelltransplantierte, ein großes Risiko dar. Vor allem Empfänger allogener Stammzellen sind gefährdet, darunter auch häufig Kleinkinder [90]. In diesem Patientenkollektiv können Adenoviren sehr schwere Verläufe bis hin zu Multiorganversagen verursachen. Diese gehen mit einer hohen Gesamtmortalität einher, welche bei disseminierten Infektionen noch weiter ansteigt [91]. Hierbei wird vermutet, dass die meisten Infektionen durch eine Reaktivierung von im Körper persistierenden Adenoviren verursacht werden [34, 92]. Das HSV-1 ist eines der am weitest verbreiteten Viren auf der Welt. Wie das Adenovirus, kann auch das HSV-1 bei Immunsupprimierten schwerwiegende Infektionen verursachen, innerhalb derer sich das Virus vom in der Regel befallenen oro-facialen Bereich auf den Respirations- sowie Gastrointestinaltrakt ausbreitet und hierdurch lebensbedrohliche Komplikationen hervorrufen kann. Neuere

Untersuchungen ließen zudem die Vermutung aufkommen, dass ein nicht zu vernachlässigender Anteil an Pneumonien bei künstlich beatmeten Patienten durch Reaktivierung latenter HSV-1-Infektionen hervorgerufen wird [93].

Auch das Varizella-Zoster-Virus kann neben den Windpocken und dem Herpes Zoster schwere Krankheitsverläufe bei Immunsupprimierten hervorrufen. In diesen Fällen spielt die Reaktivierung einer latent bestehenden Infektion durch das Virus ebenfalls eine wichtige Rolle. Auch ältere Patienten sind von VZV-Reaktivierungen besonders betroffen, da zum einen die T-Zellantwort mit steigendem Alter sinkt [94] und zum anderen bei diesem Patientenkollektiv häufigere und schwerere Komplikationen auftreten [95].

In Bezug auf die oben genannten Problematiken, die mit den Erkrankungen durch die Viren einhergehen, kommen wir nun zu der Frage, in welcher Weise der ELISpot-Assay für die Diagnostik und Therapie viraler Erkrankungen einen Nutzen bringen könnte. Zur Überprüfung vorausgegangener Virusinfektionen stehen bislang überwiegend Nachweisverfahren mittels Antikörperbestimmung zur Verfügung. Diese überprüfen lediglich die humorale Immunantwort, berücksichtigen jedoch nicht die Existenz virusbeladener Zellen, für deren Bekämpfung  $T_H1$ -Zellen und zytotoxische T-Zellen ausschlaggebend sind. Die Messung der T-Zellantwort mit dem ELISpot-Verfahren kann im Sinne eines Surrogatmarkers verwendet werden, mit dessen Hilfe der T-Zellstatus immunsupprimierter Patienten vor Einleitung einer immunsuppressiven Therapie geprüft werden kann. Bezüglich der Adenoviren gibt es bereits Studien, in denen Stammzelltransplantierten erfolgreich virusspezifische T-Zellen von Lebendspendern appliziert wurden [92, 96]. Zur Entscheidung über die Notwendigkeit und zur Überprüfung des Therapieerfolgs könnte eine T-Zelldiagnostik äußerst hilfreich sein. Im Hinblick auf HSV-1 und VZV könnte wiederum eine antivirale Therapie eingeleitet werden. Für das Varizella-Zoster-Virus könnte der Assay zusätzlich zur Überprüfung des Impferfolges dienen und somit im Sinne einer Prophylaxe und Verlaufskontrolle angewendet werden. Bezüglich des HSV-1 könnte das Testverfahren zudem auf Proben von Bronchiallavagen (BAL) angewendet werden, um intubierte Patienten, die nur eine niedrige Zahl an virusspezifischen T-Zellen aufweisen, frühzeitig zu erkennen und entsprechende Maßnahmen ergreifen zu können.

Somit kann der ELISpot ein nützliches diagnostisches Werkzeug für ein breites Anwendungsspektrum darstellen und dabei helfen, den schwerwiegenden Komplikationen der Viruserkrankungen entgegenzuwirken.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Humane Zelllinien

Für die Anzucht der Adenoviren wurde die Lungenkarzinomzelllinie H1299 verwendet. Diese ist epithelialen Ursprungs und weist eine homozygote Teildeletion im p53-Gen auf. Zu Beginn wurden für den Serotyp 8 A549-Zellen verwendet, ebenfalls eine epitheliale Lungenkarzinomzelllinie. Diese erwies sich jedoch im Laufe der Infektionsreihe gegenüber den H1299-Zellen als weniger geeignet, sodass die weiteren Infektionen mit den letztgenannten durchgeführt wurden. Die Anzucht des HSV-1 erfolgte mit Hilfe der MRC-5-Zellen, primären humanen Fibroblasten aus fetalem Lungengewebe. HFF (Human Foreskin Fibroblasts)-Zellen wurden für die Infektionen mit dem VZV verwendet, bei welchen es sich ebenfalls um fetale Fibroblasten handelt. Alle Zelllinien wurden intern vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg bezogen.

#### 2.1.2. Nährmedien und Zusatzstoffe

In folgender Tabelle sind die Nährmedien und Zusatzstoffe aufgeführt, die für die Zellkulturen und den Elispot-Assay verwendet wurden.

Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco`s modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, 41966-029
AIM-V	Gibco/Thermo Fisher Scientific, 31035-025
RPMI 1650	Pan Biotech, P04-16500
FKS	Sigma, LOT123M3398
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Pan Biotech, P06-07100

Tabelle 2: Nährmedien und Zusatzstoffe



### 2.1.3. Viren

Mit Ausnahme des Varivax Lebendimpfstoffes von Sanofi Pasteur MSD GmbH, des Adenovirus 8-2 und des HSV-1 Stamm KOS wurden sämtliche Viren von der Arbeitsgruppe Schmid vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg bezogen. Der Varivax Lebendimpfstoff mit einer Dosis von 0,5 ml ist der handelsübliche Impfstoff zur Immunisierung gegenüber Windpocken und Herpes Zoster und enthält einen lebend attenuierten Stamm des Varizella-Zoster Virus. Das HSV-1 wurde von der Arbeitsgruppe Paulus/Nevels zur Verfügung gestellt.

Das Adenovirus 8-2 wurde vom Institut für Virologie und Seuchenhygiene der medizinischen Hochschule Hannover erhalten.

<b>Virus</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
Adenovirus 1 (AdV-1)	C	
Adenovirus 2 (AdV-2)	C	
Adenovirus 3 (AdV-3)	B1	
Adenovirus 4 (AdV-4)	E	
Adenovirus 5 (AdV-5)	C	
Adenovirus 6 (AdV-6)	C	
Adenovirus 7 (AdV-7)	B1	
Adenovirus 8-1 (AdV-8-1)	D	
Adenovirus 8-2 (AdV-8-2)	D	
Adenovirus 11 (AdV-11)	B2	

Adenovirus 12 (AdV-12)	A	
Adenovirus 34 (AdV-34)	B2	
Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1) Stamm KOS		
Varizella-Zoster-Virus (VZV)/Varivax (Stamm Oka/Merck)		Sanofi Pasteur MSD GmbH
VZV (Stamm Oka/Merck)		

Tabelle 3: Viren

#### 2.1.4. Antikörper

##### 2.1.4.1. Antikörper für den Focus Forming Assay

Die folgenden Antikörper wurden zur Titerbestimmung mittels Focus Forming Assay eingesetzt.

Der Anti-Ad5 E2A B6-8 Antikörper wurde für die Adenoviren 1-7, sowie -34 verwendet, für die Adenoviren 8 und 12 wurde der Anti-Adenovirus hexon protein Antikörper eingesetzt.

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Anti-Ad5 E2A B6-8	Heinrich-Pette-Institut Leibniz- Institut für Experimentelle Virologie	1:10
Anti-Adenovirus hexon protein antibody [1E11]	Abcam; ab8251	1:500

Tabelle 4: Primärantikörper für den Focus Forming Assay

Als Sekundärantikörper für alle Adenoviren wurde der Alexa Fluor 488-conjugated Affini Pure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) verwendet.

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor 488-conjugated Affini Pure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories, INC 751-545-151	1:1000

Tabelle 5: Sekundärantikörper für den Focus Forming Assay

#### 2.1.4.2. Antikörper für den ELISpot-Assay

Folgende Primär- und Sekundärantikörper wurden für den Elispot-Assay eingesetzt.

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
anti-human INF- $\gamma$ mAB 1D1K	Mabtech, 3420-3	1:200

Tabelle 6: Primärantikörper für den ELISpot-Assay

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
anti-human INF- $\gamma$ mAB 7-B6-1 biotinylated	Mabtech, 3420-6	1:1000

Tabelle 7: Sekundärantikörper für den ELISpot-Assay

### 2.1.5. PBMC

Zur Gewinnung der PBMCs wurden Blutproben von freiwilligen Spendern entnommen. Die Probanden mussten hierfür ein Mindestalter von 18 Jahren haben. Ausschlusskriterien waren eine Seropositivität für HIV, chronische Infektionen mit Hepatitisviren, sowie andere unkontrollierte Infektionen, instabile Begleiterkrankungen, Drogenmissbrauch oder psychiatrische Störungen.

### 2.1.6. Hexonproteine

Für den ELISpot-Assay mit Adenoviren wurden zusätzlich das Adenovirus Type 2 Hexon sowie der Peptivator AdV5 Hexon – premium grade eingesetzt.

Das Adenovirus Type 2 Hexon stellt ein vollständiges Protein des AdV-2 (strain Adenoid 6) dar, welches durch Ionenaustauschchromatographie nach Ultrazentrifugation aus einer mit AdV-2-infizierten Zellkultur gewonnen wird.

Das PepTivator AdV5-Hexon ist ein Peptidpool aus 15-meren Sequenzen, welche eine Überlappung von je 11 Aminosäuren aufweisen.

Bezeichnung	Hersteller	Eingesetzte Konzentration
Adenovirus Type 2 Hexon*	Serion Immunologics, BA128VS	6 µg/ml
Peptivator AdV5 Hexon-premium grade*	Macs-Miltenyi Biotec, 130-093-495	1 µg/ ml

Tabelle 8: Hexonproteine, werden im Weiteren als Hexon 2 und Hexon 5 bezeichnet

### 2.1.7. ELISA-Testkits und Kontrollen

Folgende Testkits wurden für den ELISA als vergleichende Immunoassays zum ELISpot verwendet. Im Falle des Serion ELISA classic Adenovirus IgG wurden zwei verschiedene testspezifische Referenztabelle verwendet, je eine für Erwachsene und eine für Kinder. Zusätzlich mussten für den Serion ELISA classic Adenovirus IgG und

den Serion ELISA classic Herpes Simplex Virus 1 IgG die Kontrollen zusätzlich bezogen werden.

Bezeichnung	Hersteller
Anti-Adenovirus-ELISA(IgG)	Euroimmun EI 2680-9601 G
Serion ELISA classic Adenovirus IgG Erwachsene/Adult Kinder/children	Serion, ESR 128G
Serion ELISA classic Herpes Simplex Virus 1 IgG	Serion, ESR 1051G
Serion ELISA classic Varicella Zoster Virus IgG	Serion, ESR 104G
Adenovirus IgG control	BC128G
HSV 1 IgG control	BC1051G

Tabelle 9: Übersicht über die ELISA-Testkits und Kontrollen

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Kultivierung und Lagerung der humanen Zelllinien**

Alle drei Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 175 cm<sup>2</sup> bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Passagierung fand zweimal wöchentlich statt. Das Protokoll war bei allen drei Zelllinien identisch.

Das Medium wurde aus der Flasche abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS (Sigma; D8537) gewaschen, um mögliche Reste des FKS zu entfernen. Anschließend erfolgte die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden mittels Trypsin/EDTA (PanBiotech; P06-07100). Hierbei wurden die Zellen mit 5ml des Enzyms inkubiert. Bei den MRC-5-Zellen dauerte dies ca. 3 Minuten, bei den HFF-Zellen 4 Minuten und bei den H1299-Zellen etwa 8 Minuten. Zum Abstoppen der Reaktion wurde jeweils 10 ml DMEM (+10% FKS+1% Pen/Strep) hinzugefügt und die Zellsuspension 5 Minuten bei 1200 rounds per minute (rpm) zentrifugiert (Rotixa 50 RS; Hettich). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml DMEM (+10% FKS+1% Pen/Strep) aufgenommen.

Für die Passagierung wurden neue Zellkulturflaschen mit je 30 ml DMEM (+10% FKS +1% Pen/Strep) verwendet. Aufgrund des unterschiedlichen Wachstums der Zelllinien musste das Teilungsverhältnis entsprechend angepasst werden. MRC-5-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:5, HFF-Zellen 1:2 und H1299-Zellen 1:10 passagiert.

### **2.2.2. Virusanzucht**

#### **2.2.2.1. Infektion der H1299-Zellen mit Adenoviren**

Zu Beginn wurden 5×10<sup>5</sup> der H1299-Zellen für die Infektion mit Adenoviren in 8ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep) in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach einem Tag erfolgte die Infektion der Zellen bei einer Konfluenz von 70-80%. Hierfür wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgenommen und verworfen. Ein Milliliter der Virussuspension wurde in 3 ml DMEM<sub>ohne</sub> (ohne jegliche Zusätze) aufgenommen und in der Zellkulturflasche 1 Stunde lang unter regelmäßigem Schwenken bei 37° und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss wurden 5 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep) hinzugefügt. Im Laufe der Virusanzucht wurden die Infektionen Schritt für Schritt in Zellkulturflaschen größerer Volumina durchgeführt. Das Verfahren änderte sich hierbei grundsätzlich nicht, jedoch musste die Zahl ausgesäter Zellen

sowie das Volumen des Mediums und die Menge an Virussuspension an die Flaschengröße angepasst werden. Auf 75 cm<sup>2</sup> wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen in 15 ml Medium ausgesät, die Infektion fand mit 4 ml Medium statt. Anschließend wurden weitere 10 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep) hinzugegeben. In die Zellkulturflaschen der Größe 175 cm<sup>2</sup> wurden  $3,5 \times 10^6$  Zellen in 30 ml ausgesät. Die Inkubation über 1 Stunde fand in 8 ml DMEM<sub>ohne</sub> statt und das im Anschluss zugegebene Volumen betrug 20 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep). Wie in 1.5. erwähnt wurde, war die Anzucht der Viren in FKS-freiem Medium ein wichtiges Ziel der Arbeit. Um die Virussuspension in FKS-freiem Medium zu erhalten, wurde ab dem Ansatz von vier Flaschen der Größe 175 cm<sup>2</sup> das Protokoll leicht abgeändert. Von diesem Zeitpunkt an wurde die Zellen in DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep) ausgesät. Am Tag der Infektion wurde das Medium abgezogen und verworfen und die Zellen anschließend mit 10 ml PBS gewaschen. Die Inkubation der Zellen mit der Virussuspension erfolgte wie oben beschrieben. Nach einer Stunde erfolgte nun die Zugabe von 20 ml AIM-V. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (NK) erstellt. Hierfür verblieb ein Zellrasen mit H1299-Zellen ohne Infektion durch Adenoviren und wurde im weiteren Verlauf analog zur Virussuspension behandelt.

#### **2.2.2.2. Infektion der MRC-5-Zellen mit HSV-1**

Für die Infektionsreihe des HSV-1 wurden  $5 \times 10^5$  die MRC-5-Zellen in 8 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep) in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach einem Tag erfolgte die Infektion der Zellen bei einer Konfluenz von 70-80%. Hierfür wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgenommen und verworfen. Ein Milliliter der Virussuspension wurde in 3 ml DMEM<sub>ohne</sub> (ohne jegliche Zusätze) aufgenommen und in der Zellkulturflasche 1 Stunde lang unter regelmäßigem Schwenken bei 37° und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss wurden 5 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep) hinzugefügt. Wie im Falle des Adenovirus wurden auch hier die Infektionen im Verlauf in Zellkulturflaschen größerer Volumina durchgeführt. Auf 75 cm<sup>2</sup> wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen in 15 ml Medium ausgesät, die Infektion fand mit 4 ml Medium statt, anschließend wurden weitere 10 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep) hinzugegeben. In die Zellkulturflaschen der Größe 175 cm<sup>2</sup> wurden  $3,5 \times 10^6$  Zellen in 30 ml ausgesät. Die Inkubation über 1 Stunde fand in 8 ml DMEM<sub>ohne</sub> statt. Im Anschluss wurden 20 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep) zugegeben. Um auch

das HSV-1 in FKS-freiem Medium zu erhalten, wurde ab dem Ansatz von vier Flaschen der Größe 175 cm<sup>2</sup> das Protokoll entsprechend abgeändert. Die Aussaat der MRC-5 erfolgte in DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep). Am Tag der Infektion wurde das Medium abgezogen und verworfen und die Zellen anschließend mit 10 ml PBS gewaschen. Die Inkubation der Zellen mit der Virussuspension erfolgte wie oben beschrieben. Nach einer Stunde erfolgte dann die Zugabe von 20 ml AIM-V. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle erstellt. Hierfür wurde ein Ansatz mit MRC-5-Zellen bei der Infektion ausgelassen und im weiteren Verlauf analog zur Virussuspension behandelt.

#### **2.2.2.3. Infektion der HFF-Zellen mit VZV**

Für die Infektion mit VZV wurden  $5 \times 10^5$  HFF-Zellen in 8 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep) in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> ausgesät. Die Infektion der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 70-80%. Hierfür wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgenommen und verworfen. Ein Milliliter der Virussuspension wurde in 3 ml DMEM<sub>ohne</sub> (ohne jegliche Zusätze) aufgenommen und in der Zellkulturflasche 1 Stunde lang unter regelmäßigem Schwenken bei 37° und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss wurden 5 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep) hinzugefügt. Im Laufe der Virusanzücht wurden die Infektionen Schritt für Schritt in Zellkulturflaschen größerer Volumina durchgeführt. Das Verfahren änderte sich hierbei grundsätzlich nicht, jedoch musste die Zahl ausgesäter Zellen sowie das Volumen des Mediums und die Menge an Virussuspension an die Flaschengröße angepasst werden. Auf 75 cm<sup>2</sup> wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen in 15 ml Medium ausgesät, die Infektion fand mit 4 ml Medium statt, anschließend wurden weitere 10 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep) hinzugegeben. In die Zellkulturflaschen der Größe 175 cm<sup>2</sup> wurden  $3,5 \times 10^6$  Zellen in 30 ml ausgesät. Die Inkubation über 1 Stunde fand in 8 ml DMEM<sub>ohne</sub> statt. Das im Anschluss zugegebene Volumen betrug 20 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep). Im Gegensatz zu den Infektionsreihen der Adenoviren und des HSV-1 blieb das Protokoll hier über den gesamten Zeitraum unverändert. Am Tag der Infektion wurde das Medium abgezogen und verworfen und die Zellen anschließend mit 10 ml PBS gewaschen. Die Inkubation der Zellen mit der Virussuspension erfolgte wie oben beschrieben. Nach einer Stunde erfolgte dann die Zugabe von 20 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep). Auch hier wurde eine Negativkontrolle erstellt, in dem ein



Ansatz mit HFF-Zellen bei der Infektion ausgelassen und im weiteren Verlauf analog zur Virussuspension behandelt wurde.

#### **2.2.2.4. Virusernte**

Die Ernte der Adenoviren sowie des HSV-1 erfolgte, sobald ein deutlicher zytopathischer Effekt (CPE) erkennbar war. Dieser variierte bei den verschiedenen Serotypen des Adenovirus (s.3.1.2.1.), zeigte sich in der Regel jedoch nach etwa 48 Stunden (p.i.) und zeichnete sich anfangs durch eine für Adenoviren typische Gitterbildung und Abrundung der ehemals konfluenten Zellen aus. Im weiteren Verlauf kam es zu einer vollständigen Ablösung der Zellen. Auch im Falle des HSV-1 war der CPE nach ca. 48 Stunden deutlich zu sehen. Die Ernte des VZV erfolgte 12 Tage p.i.. Die Adenoviren wurden über folgende Aufreinigung gewonnen. Das Medium wurde mitsamt der abgelösten Zellen abgenommen. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und das Pellet mit 10 ml PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde erneut 5 Minuten lang bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml DMEM<sub>ohne</sub> aufgenommen. Die Zellsuspension konnte bis zum Zellaufschluss bei -20°C gelagert werden.

Das HSV-1 wurde aus dem Überstand gewonnen, das VZV sowohl aus den Zellen als auch aus dem Überstand.

Für die Gewinnung der Viren aus dem Überstand wurde das Medium mitsamt der Zellen aus der Zellkulturflasche abgenommen und 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Im Falle des VZV war für die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden das Abkratzen mittels Zellschaber (Sarstedt; 25 cm; 83.1830) notwendig.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, in ein neues Falcon überführt und das Pellet verworfen.

Die gewonnenen Virensuspensionen wurden bei -20°C gelagert.

#### **2.2.2.5. Aufschluss der Zellen**

Im Anschluss an die Virusernte wurden die H1299- und die HFF-Zellen zur Virusgewinnung aufgeschlossen.

Für den Aufschluss der Zellen wurden die Zellsuspensionen dreimal im Wechsel in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in warmem Wasser aufgetaut.

Im Anschluss wurden die Suspensionen für 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenen Viren wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. Das Pellet mit den übrig gebliebenen Zellresten wurde verworfen.

### **2.2.3. Titerbestimmung**

#### **2.2.3.1. Sequenzierung und Titerbestimmung mittels PCR**

Alle Viren wurden zur Bestimmung des DNA-Titers in das hauseigene PCR-Labor eingeschickt. Der Titer wurde entsprechend der festgestellten Anzahl an DNA-Kopien in copies/ml angegeben.

Bezüglich der Adenoviren fand, zum Ausschluss von möglichen Kreuzvarianten, zusätzlich eine Sequenzierung und Genotypisierung in der Routinediagnostik statt.

#### **2.2.3.2. Titerbestimmung mittels Focus Forming Assay (FFA)**

Die Titerbestimmung mit Hilfe des FFA wurde für die verschiedenen Serotypen des Adenovirus durchgeführt. Der FFA kann als eine Variation des Plaque-Assay betrachtet werden. In beiden Fällen werden Zellmonolayer mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Virus infiziert, wodurch Plaques in der fixierten Zellschicht entstehen. Im Falle des FFA werden diese Plaques mit Hilfe fluoreszenzgekoppelter Antikörper detektiert, welche gegen spezifische Strukturen des sich replizierenden Virus gerichtet sind. Eine Plaque entspricht hierbei einem replikationsfähigen Virus. Im Fluoreszenzmikroskop können diese Plaques in Form von „Foci“ sichtbar gemacht und quantifiziert werden. Das Ergebnis wird in Focus Forming Units/ ml (FFU/ml) angegeben.

Pro Virus wurde eine 6-Wellplatte (Falcon; Multiwell; 353046) mit  $3 \times 10^5$  H1299-Zellen pro Vertiefung in 3 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep) ausgesät. Am Tag 2 wurde eine Verdünnungsreihe der Viren hergestellt. Zu Beginn war dies bei allen Viren eine Verdünnung von  $10^{-2}$  –  $10^{-7}$ .

Aufgrund mangelnder Auswertbarkeit bei einigen Viren wurde ein zweiter Ansatz mit einer niedrigeren Verdünnungsreihe durchgeführt.

Für die Serotypen AdV-5, -6 und -8-2 lag diese im Bereich von  $10^1$  –  $10^{-5}$ , für AdV-7 und -34 zwischen  $10^{-1}$  und  $10^{-6}$

Das Medium wurde vor der Infektion aus den Vertiefungen abgesaugt und verworfen und diese mit 3 ml PBS, das auf 37°C vorgewärmt wurde, gewaschen.

Anschließend erfolgte die Zugabe der verschiedenen Viruskonzentrationen auf die Zellen (1 ml/ Vertiefung) und die Inkubation der Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für eine Stunde. Alle 10 Minuten wurden die Platten geschwenkt. Nach einer Stunde wurde die Virussuspension abgezogen und verworfen. Pro Ansatz wurden 3 ml DMEM (+10% FKS + 1% Pen/Strep) hinzugegeben und die Platten für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. 24 Stunden p.i. wurde das Medium abgezogen und die Platten 5 Minuten mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit eiskaltem Methanol (3 ml/ Vertiefung) für 15 Minuten bei -20°C. Nach Abzug des Methanols wurden die Platten getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Vertiefungen zweimal für 5 Minuten mit TBS-BG-Puffer (500 ml Tris/HCl pH 6,7; 685 ml NaCl; 150 ml KCl; 50 ml MgCl<sub>2</sub>; 25 g Glycin; 25 g BSA; 2,5 ml Tween 20; 25 ml Na-Azid) gewaschen. Im Anschluss fand die Zugabe des primären Antikörpers (s. 2.1.4.1.) statt. Das Verfahren war bis auf die Inkubationsdauer bei beiden Antikörpern identisch. Je 1 ml des Antikörpers wurde pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Am Folgetag wurde der Anti-Ad5 E2A B6-8 Antikörper abgezogen und durch einen Filter der Größe 0,22 µm filtriert, der Anti-Adenovirus hexon protein antibody [1E11] nach 48 Stunden. Die Filtration der Antikörper nach Benutzung dient dabei der Beseitigung etwaiger Verunreinigungen durch z.B. Zellen und Medium. Hierdurch kann der Antikörper mehrmals hintereinander verwendet werden. Die Platten wurden anschließend dreimal in Folge, für 5 Minuten, 10 Minuten, 5 Minuten, mit TBS-BG gewaschen und dabei auf einem Schüttler fließend bewegt.

Nach dem Waschvorgang wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben und im Dunkeln für drei Stunden unter fließender Bewegung inkubiert. Im Folgenden wurde der Antikörper abgezogen und filtriert. Es folgte ein zweiter Waschschrift, bei dem die Platten wiederum dreimal mit TBS-BG, über 15 Minuten, 10 Minuten, 5 Minuten, unter fließender Bewegung gewaschen wurden. Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe von 1 ml TBS-BG zu jeder Vertiefung und die anschließende Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Keyence; BZ-9000(Biorevo)) Zuerst wurde die Zellebene mittels „Brightfieldmodus“ der 10-fachen Vergrößerung eingestellt. Anschließend

wurde in den Fluoreszenzmodus mit GFP (grün fluoreszierendes Protein) auf 20-fache Vergrößerung gewechselt. Es wurde ein Bereich ausgewählt, in dem die Anzahl etwa 30 fluoreszierende Foci betrug und dies mit der Verdünnungsstufe sowie mit dem Faktor 1218, gemäß dem Protokoll, entsprechend der Fläche des Sichtfelds multipliziert. Das errechnete Ergebnis entspricht dem Virustiter in der Einheit Focus Forming Units (FFU).

#### **2.2.3.3. Titerbestimmung mittels Plaque Assay**

Die Titerbestimmung für das HSV-1 erfolgte mittels Plaque Assay. Da bei den Serotypen 7, 8 und 34 des Adenovirus keine auswertbaren Ergebnisse durch die Titerbestimmung mit dem FFA erzielt werden konnten, wurde auch hier zusätzlich ein Plaque Assay durchgeführt.

Für die Testdurchführung wurden Zellen auf 12-Wellplatten ausgesät. Im Fall der Adenoviren waren dies H1299-Zellen. MRC-5-Zellen wurden, wie auch bei den Infektionsreihen, für das HSV-1 verwendet. Hierfür wurden Zellen wie in 2.2.1. abtrypsinisiert und gezählt. Anschließend wurden je  $1,5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml DMEM (+10% FKS/+1% P/S) in die Vertiefungen gegeben und über Nacht im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion der Zellen bei einer Konfluenz von etwa 90%. Die Virussuspensionen wurden zuvor im Becher-Resonator sonifiziert (10 Pulse; duty cycle: 0,8; output control 8). Im Anschluss wurden verschiedene Verdünnungsstufen des jeweiligen Virus hergestellt. Nach einem ersten Ansatz mit HSV-1, in dem die Verdünnungsstufen  $10^{-6}$ - $10^{-11}$  verwendet wurden und in dem keine sichtbaren Plaques entstanden sind, wurden die Verdünnungsstufen  $10^{-2}$ - $10^{-7}$  für die weiteren Versuche gewählt. Pro Virus wurden je zwei Aliquots erstellt, um sicherzustellen, dass die erhaltenen Ergebnisse zuverlässig und vergleichbar sind. Nach Herstellung der Verdünnungsreihe wurde das Medium aus zwei Wells abgezogen und verworfen und 322 µl aus je einem Ansatz in die Vertiefung gegeben. Die Platten wurden anschließend für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Viruslösung aus den Wells abgezogen und verworfen und je 2 ml eiskaltes Methocel auf die Zellen gegeben. Die Färbung der Platten erfolgte, wenn deutliche Plaques erkennbar waren. Hierfür wurde das Methocel abgezogen und verworfen und jede Vertiefung mit 2 ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde je 1 ml Methylenblaulösung (70% MeOH; 29,5% H<sub>2</sub>O; 0,5%

Methylenblau) in die Vertiefungen gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Methylenblau verworfen und die Platten wurden solange mit deionisiertem Wasser gespült, bis es sich nicht mehr blau verfärbte. In einem letzten Schritt wurden die Platten über Kopf getrocknet und konnten anschließend durch manuelle Auszählung der Plaques unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden.

#### **2.2.4. Inaktivierung der Viren**

Im Zuge der Virusinaktivierung wurden zwei verschiedene Versuchsansätze durchgeführt und miteinander verglichen - die Inaktivierung mittels Hitze und mittels ultraviolett (UV)-Strahlung. Im Falle der Adenoviren wurde der Erfolg mit Hilfe des FFA überprüft. Hierfür wurde exemplarisch das AdV-1 ausgewählt, da dieses im zuvor durchgeführten Focusassay eindeutig bestimmbar war. Eine Positivkontrolle diente zur Feststellung der erfolgreichen Inaktivierung. Die Hitzeinaktivierung wurde auch bei VZV und HSV-1 durchgeführt. Das HSV-1 wurde zusätzlich mit UV behandelt. Das Ergebnis wurde mittels Infektion von Zellen, wie in 2.2.2.1. beschrieben, ermittelt. Hierfür wurden neben den UV-behandelten Viren zudem eine Positiv- und eine Negativkontrolle angesetzt. Der Erfolg der Hitzeinaktivierung wurde in beiden Fällen ausschließlich im ELISpot getestet.

##### **2.2.4.1. Inaktivierung mittels Hitze**

In diesem Ansatz wurde das Virus in einem Heizblock auf 56°C erhitzt und darin für 10 Minuten inkubiert.

Im Anschluss erfolgte eine Sonifizierung des Virus über 10 Minuten, um eventuell verklumpte Viruspartikel wieder gleichmäßig in der Suspension zu verteilen.

Aufgrund nicht zufriedenstellender Ergebnisse wurde dasselbe Experiment ein zweites Mal bei 70°C und 30-minütiger Behandlung und anschließender Sonifizierung wiederholt.

#### **2.2.4.2. Inaktivierung mittels UV**

Nachdem erste Testversuche mit einer Inaktivierung durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm über 30 Minuten unter der Sicherheitswerkbank nicht das erwünschte Ergebnis erbrachten, wurde ein zweiter Versuch durchgeführt. Hierbei wurde das AdV-1 und das HSV-1 in einem geöffneten Reagenzgefäß mit jeweils  $2 \times 500,000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  einmal im Stratalinker 1800 (Stratagene) und zum anderen im Stratalinker 2400 (Stratagene) inaktiviert. Im Anschluss wurden die Viren für 10 Minuten sonifiziert.

#### **2.2.5. ELISpot-Assay**

19 Probanden wurden zweimal im Abstand von 6 Wochen auf ihre T-Zellantwort gegenüber Adenoviren, HSV-1 und VZV im ELISpot geprüft. Voraussetzung für die Eignung als Proband galt ein Mindestalter von 18 Jahren sowie der Ausschluss von unkontrollierten Infektionen oder anderen stark beeinträchtigenden Begleiterkrankungen. Nach Aufklärung der Probanden und Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung wurde von den Probanden eine Blutprobe gewonnen, aus denen anschließend PBMC isoliert wurden, die auch die notwendigen T-Zellen enthalten. Neben den 10 Serotypen des Adenovirus wurden auch die rekombinanten Hexonproteine getestet. Da das Hexon 5 erst im Verlauf der ELISpot-Studie hinzukam, wurden hier nur 15 Probanden zur Testung herangezogen. Zu den Probanden, deren Ergebnisse in die Gesamtauswertung einfließen, kommen weitere 8 hinzu, mit deren Hilfe Vorversuche durchgeführt wurden. Diese haben im Rahmen der Studie aufgrund mangelnder Vergleichbarkeit keinen Einzug gefunden.

Der Versuchsaufbau und die Versuchsdurchführung fanden zu beiden Zeitpunkten unter identischen Bedingungen statt.

Der ELISpot-Assay wurde mit 96-Well MB Multiscreen PVDF-Platten (MerckMillipore; MAIPS4510) durchgeführt. Zu Beginn wurden die Platten einmal mit je 15  $\mu\text{l}$  35-prozentigem Ethanol und anschließend zweimal mit je 200  $\mu\text{l}$  PBS (Sigma) gewaschen. Im Anschluss erfolgte das Beschichten mit dem anti-human INF- $\gamma$  mAB 1D1K (Verdünnung 1:200 mit PBS). Pro Vertiefung wurden je 100  $\mu\text{l}$  der Verdünnung eingesetzt und die Platten für 1 Tag bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Platten sieben Mal mit je 200  $\mu\text{l}$  PBS pro Vertiefung gewaschen, um nicht am Boden fixierte

Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden je 200 µl PBS (Sigma) + 0,5% BSA (Sigma; 05488) hinzugegeben, um freie Stellen am Boden der Vertiefungen zu blockieren. Hiermit wurde gewährleistet, dass es später zu keiner unspezifischen Reaktion der PBMC mit Bestandteilen der Bodenbeschichtung kam. Nach Zugabe des BSA wurden die Platten für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In einem nächsten Schritt wurden die Platten erneut sieben Mal mit je 200 µl PBS pro Vertiefung gewaschen, um nicht gebundenes BSA zu entfernen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Antigene nach folgendem Schema:

	Well 1-3	Well 4-6	Well 7-9	Well 10-12
A	AIM-V	AdV-8	HSV-1	VZV
B	AdV-1	AdV-12	NK	NK
C	AdV-2	AdV-34	AIM-V	DMEM+FKS
D	AdV-3	Hexon 2		
E	AdV-4	Hexon 5		
F	AdV-5	NK		
G	AdV-6	DMEM		
H	AdV-7	AIM-V		PMA/IONO

Tabelle 10: Pipettierschema für den ELISpot-Assay in 96-Well MB Multiscreen PVDF-Platten

Die Hexonproteine wurden mit einer Konzentration, wie in 2.1.6 beschrieben, eingesetzt. Als Positivkontrolle für alle drei getesteten Viren wurden PMA und IONO mit je 2 µl eingesetzt. PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) gehört der Gruppe der Phorbolster an und ist in der Lage, die intrazelluläre Proteinkinase C zu aktivieren. Iono (Ionomycin) wird von dem Bakterium *Streptomyces conglobatus* gebildet und fungiert als Calciumionentransporter an biologischen Membranen. In Kombination werden beide Stoffe als unspezifische Stimulanzen des erworbenen Immunsystems eingesetzt. Insgesamt wurden drei Negativkontrollen getestet: die im Test verwendeten Medien DMEM und AIM-V sowie die virusspezifischen Negativkontrollen (s.2.2.2.1-3.). Well 1-6 stellte hierbei die Versuchsreihe des Adenovirus dar, 7-9 die des HSV-1, 10-12 wurde für das VZV verwendet.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten und stark abweichende Ergebnisse identifizieren zu können, wurde für jedes Virus ein Triplet auf

der Mikrotiterplatte verwendet. Die im ELISpot eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Virus	Eingesetzte Konzentration (copies/ml)
AdV-1	$1 \times 10^8$ c/ml
AdV-2	$1 \times 10^8$ c/ml
AdV-3	$1 \times 10^8$ c/ml
AdV-4	$1 \times 10^8$ c/ml
AdV-5	$1 \times 10^8$ c/ml
AdV-6	$1 \times 10^8$ c/ml
AdV-7	$1 \times 10^8$ c/ml
AdV-8	$4,3 \times 10^6$ c/ml
AdV-12	$1,25 \times 10^7$ c/ml
AdV-34	$3,3 \times 10^6$ c/ml
HSV-1	$1,3 \times 10^7$ c/ml
VZV	$1,4 \times 10^5$ c/ml

Tabelle 11: Übersicht über die im ELISpot eingesetzten Virustiter in copies/ml

Die eingesetzten Konzentrationen, welche mit Hilfe des PCR-Titers (s. 2.2.3.1.) berechnet wurden, wurden im Falle der Adenoviren nach Möglichkeit aufeinander abgestimmt. Jedoch war es nicht bei allen Serotypen möglich, die gleiche Konzentration zu wählen. Da das AdV-8, -12 und das AdV-34 deutlich niedrigere Titer aufwiesen als die restlichen Serotypen, wurde hier von dem gemeinsamen Titer von  $10^8$  c/ml abgewichen und ein niedrigerer gewählt. Das HSV-1 und das VZV wurden ebenfalls mit entsprechenden Titern eingesetzt.

Parallel zu der Herstellung der Platte wurden die PBMC wie in 2.2.5.1. beschrieben hergestellt und ausgezählt. In jede Vertiefung wurden anschließend  $2 \times 10^5$  Zellen in 100 µl Medium gegeben, abgedeckt und über Nacht im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten sieben Mal mit 200 µl PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von je 100 µl des Sekundärantikörpers pro Vertiefung. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend sieben Waschschrte mit 250 µl PBS. Nach Beendigung des letzten Waschschrts wurde das Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Strep-AP)-Konjugat (Mabtech, 3310-



8) hinzugegeben und die Platten für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vertiefungen wurden erneut siebenmal mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt wurde die Substratlösung NBT-BCIP (Thermo Fisher Scientific, 34042) auf die Vertiefungen gegeben und im Dunkeln für etwa 10 Minuten inkubiert, bis eindeutige Spots in den Vertiefungen erkennbar waren. Hierbei musste regelmäßig überprüft werden, dass die Färbung nicht zu stark wurde und die Reaktion dementsprechend früher beendet werden muss. Das Beenden erfolgte durch dreimaliges Spülen mit Leitungswasser. Die Platte wurde anschließend eine weitere Nacht im Dunkeln zum Trocknen bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und konnte am nächsten Tag mit dem ELISpot Reader (AID Elispot) ausgewertet werden.

#### **2.2.5.1. Isolierung der PBMC**

Für die Präparation der PBMC wurden pro Proband 2 Röhrchen mit je 7,5 ml Lithium-Heparinblut benötigt. Diese wurden mit 0,6 ml RPMI pro Milliliter Blut vermischt und anschließend in zwei Leukosep-Röhrchen umgefüllt. Die Röhrchen wurden bereits zuvor mit Ficoll-Paque PLUS befüllt und 30 Sekunden bei 1000 g zentrifugiert, wodurch das Separationsmedium zum Schluss unter der Trennscheibe vorlag. Der Inhalt der Röhrchen wurde dann für 10 Minuten bei 1000 g ohne Bremse zentrifugiert, sodass die einzelnen Blutbestandteile entlang ihres Dichtegradienten aufgetrennt wurden. Am Boden befanden sich anschließend Erythrozyten und Granulozyten, oberhalb der Trennscheibe Blutplasma, Separationsmedium und eine dünne weißliche Schicht, die aus den PBMC und Thrombozyten bestand.

Diese Schicht konnte mit Hilfe einer Saugpipette abgenommen und in ein 50-ml-Röhrchen überführt werden. Die PBMC wurden im Anschluss mit RPMI auf 20 ml aufgefüllt und für 7 Minuten bei 600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zuerst mit 1 ml RPMI resuspendiert und anschließend auf 10 ml weiter aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde erneut für 7 Minuten bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und das Pellet in 1 ml AIM-V aufgenommen. Im Anschluss wurde die Zellzahl mit Hilfe des ViCell-Zellzählgeräts bestimmt. Hierfür wurde eine Probe mit der Verdünnung 1:20 verwendet. Mit Hilfe der errechneten Zellzahl vitaler Zellen konnte das für den ELISpot benötigte Volumen der Zellsuspension bestimmt werden.

### **2.2.6. ELISA**

Als Vergleichstest zum ELISpot wurde für die Adenoviren, das HSV-1 sowie das VZV der Serion ELISA „classic“ verwendet. Im Falle der Adenoviren wurde zusätzlich der ELISA von Virion Serion für Kinder sowie ein ELISA-Test von Euroimmun eingesetzt. Als Probenmaterial wurde das Probandenplasma verwendet, welches bei der Isolierung der PBMC durch Zentrifugieren des Lithium-Heparin-Blutes im Überstand verblieb. Dieses Plasma wurde hierfür bis zum Einsatz bei -20°C gelagert.

#### **2.2.6.1. Anti-Adenovirus-ELISA (IgG) Euroimmun**

Der Anti-Adenovirus-ELISA (IgG) von Euroimmun wurde als einer von zwei gebrauchsfertigen Testkits zur quantitativen Bestimmung humaner IgG-Antikörper gegen Adenoviren verwendet. Der Test wurde entsprechend der Arbeitsanleitung des Herstellers durchgeführt. Alle Reagenzien wurden 30 Minuten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. In einem ersten Schritt fand die Probenverdünnung mit einem Verhältnis von 1:100 statt. Hierfür wurden 10 µl des jeweiligen Plasmas in 1 ml Probenpuffer aufgenommen und mit dem Vortexgerät vermischt. Anschließend wurden dem zuvor erstellten Pipettierschema entsprechend je 100 µl der verdünnten Proben in die Reagenzgefäße der antigenbeschichteten Mikrotiterstreifen gegeben. Zusätzlich zu den Patientenproben wurden Positiv- und Negativkontrolle sowie drei Kalibratoren mit 2, 20 und 200 RE<sup>2</sup>/ml<sup>3</sup> mit demselben Volumen in die jeweiligen Reagenzgefäße pipettiert. Die weiteren Schritte, welche aus Konjugat-Inkubation, Substrat-Inkubation und dem Abstoppen der Farbreaktion bestanden, fanden im BEP (Behring ELISA Prozessor, Siemens) statt. Die Ergebnisse wurden anschließend photometrisch ausgemessen und die Ergebnisse anhand der durch die Kalibratoren berechneten Standardkurve PC-gestützt ermittelt. Der „Cut-off-Wert“ für nicht-infizierte Personen liegt nach dieser Einheit bei 20 RE/ml. Als negativ galt eine Probe mit einem Wert kleiner als 16 RE/ml. Werte zwischen 16 und 22 RE/ml wurden als grenzwertig betrachtet, Werte über 22 RE/ml waren als positiv anzusehen.

---

<sup>2</sup> Aufgrund des Mangels eines internationalen Referenzserums verwendet Euroimmun Relative Einheiten (RE/ml)

#### **2.2.6.2. Serion ELISA classic IgG**

Der Immunoassay von Serion wurde für alle drei Virusarten verwendet. Für das Adenovirus wurden zudem zwei verschiedene Grenzwertbereiche, für Kinder und für Erwachsene angewendet. Die Durchführung des Tests war stets identisch. In einem ersten Schritt fand die Verdünnung der Proben statt. 10 µl Serum wurden in 1 ml gebrauchsfertigem Verdünnungspuffer aufgenommen und mit Hilfe eines Vortexgerätes homogen vermischt. 100 µl der verdünnten Proben wurden daraufhin nach zuvor festgelegtem Schema in die Vertiefungen der antigenbeschichteten Mikrotiterstreifen gegeben, zusammen mit dem Leerwert, der Positivkontrolle, der Negativkontrolle sowie den zwei Standardseren. Die weitere Auswertung fand mit Hilfe des Serion Immunomat<sup>tm</sup> statt, in welchem die diversen Waschschriffe, die Substrat- und Konjugatzugabe als auch das Abstoppen der Reaktion durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte softwaregestützt. Der Hersteller verwendet hier als Einheit zur Feststellung des Vorhandenseins von Antikörpern die optische Dichte (OD). Die Orientierung erfolgte anhand des ermittelten „Cut off“-Wertes. Eine Probe, deren OD um mehr als 10% unter der des Cut off-Serums lag, galt als negativ. Als positiv wurden Proben gewertet, welche um mehr als 10% über dem Cut off-Wert lagen. Grenzwertig galten alle Ergebnisse mit einer OD deren Wertebereich 10% der Cut off-OD nicht unter- oder überschritten.

### **3. Ergebnisse**

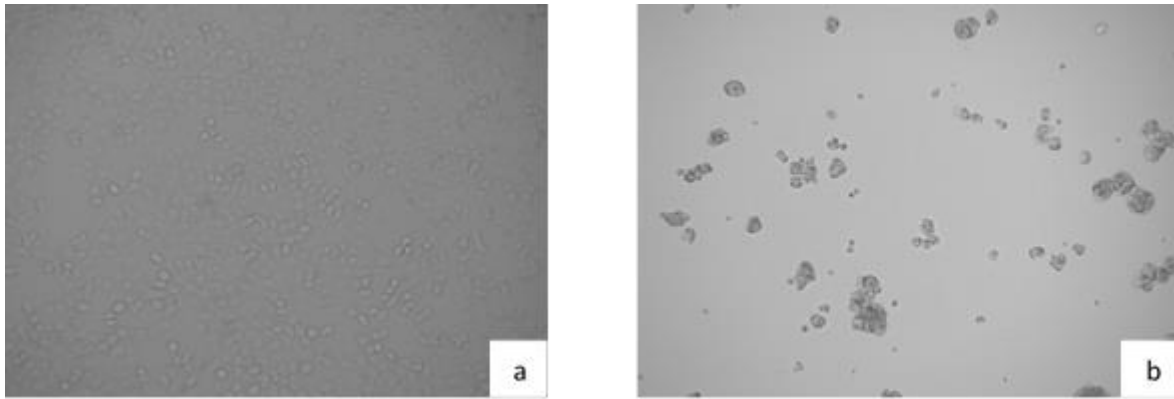
#### **3.1. Virusanzucht**

##### **3.1.1. Auswahl der Zellen und Nährmedien**

Um eine adäquate Anzucht der Viren zu gewährleisten, galt es zu Beginn sowohl die richtigen Zellen als auch das passende Medium für die jeweiligen Viren zu wählen. Hierbei bestand ein Konflikt zwischen den optimalen Bedingungen der Zellanzucht und den optimalen Bedingungen für den ELISpot. Die Zellen benötigen eine Vielzahl von Proteinen, welche im FKS enthalten sind, um „gesund“ zu wachsen und sich vermehren zu können. Im ELISpot wiederum kann die Verwendung von FKS-haltigem Medium zu Verfälschungen im Ergebnis führen und ist somit kritisch zu betrachten (s.1.5.). Somit musste ein Weg gefunden werden, die Viren in FKS-freiem Medium anzuzüchten und gleichzeitig die Vitalität der für die Infektion nötigen Zellen nicht einzuschränken. Das Standardmedium für den ELISpot stellt AIM-V dar.

##### **3.1.1.1. Versuch des Mediumwechsels bei H1299**

In dem Versuch sollte überprüft werden, ob es möglich ist, H1299-Zellen in reinem AIM-V anzuzüchten. Hierfür wurden die Zellen wie beschrieben behandelt. Um diese langsam an das Medium zu gewöhnen, wurden in der ersten Passage 50% DMEM + 10% FKS und 50% AIM-V verwendet. In der zweiten Passage wurden die Zellen in 100% AIM-V kultiviert. Eine Kontrolle mit DMEM + 10% FKS wurde ebenfalls erstellt. Abbildung 4a zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme der Zellen in FKS-haltigem Medium am 2. Tag nach der Passagierung, Abbildung 4b denselben Ansatz mit reinem AIM-V.

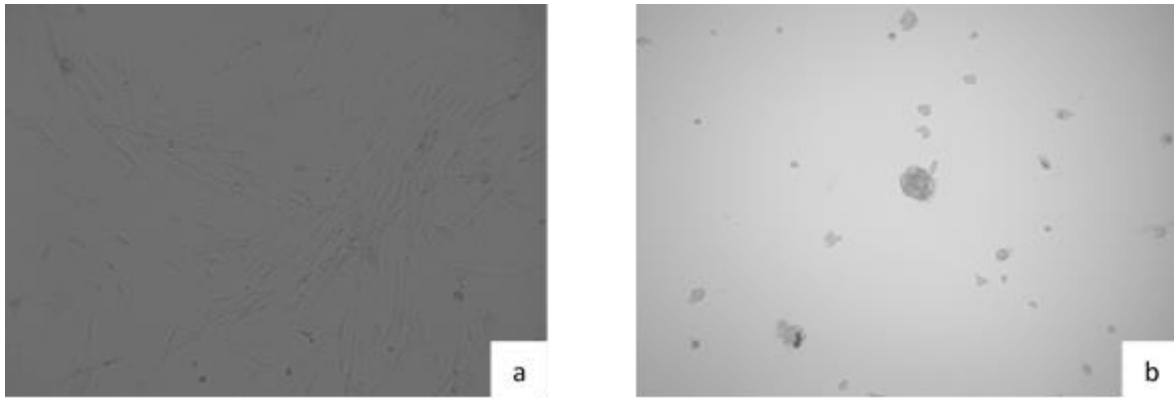


**Abbildung 4: Vergleich der eingesetzten Medien bei H1299.** **a:** H1299-Zellen wurden in DMEM +10% FKS kultiviert, lichtmikroskopische Aufnahme mit 10-facher Vergrößerung., **b:** dargestellt sind H1299-Zellen nach der ersten Passage mit 100% AIM-V, lichtmikroskopische Aufnahme mit 10-facher Vergrößerung. Zur Gewöhnung der Zellen an das neue Medium wurden in der ersten Passage 50% DMEM + 10% FKS und 50% AIM-V verwendet.

Im Vergleich ist ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Ansätzen sichtbar. In Abbildung a ist ein dichter Zellrasen mit deutlich konfluenten Zellen zu erkennen, in welchem der überwiegende Teil der Zellen eine ähnliche Größe aufweist. In Abbildung b hingegen zeigen sich bereits deutliche Lücken im Zellverband. Die Zellen sind teilweise entrundet und wirken aufgetrieben, was als Zeichen für eine Mangelsituation und eine Einbuße an Zellvitalität gewertet werden kann. Dieses Ergebnis hatte zur Konsequenz, dass ein Kompromiss gefunden wurde, welcher in 2.2.2.1. beschrieben ist. So wird ein gutes Wachstum der Zellen bis zum Tag der Infektion gewährleistet. Die Infektion selbst findet FKS-frei statt.

### 3.1.1.2. Versuch des Mediumwechsels bei MRC-5

Auch die MRC-5-Zellen wurden in unterschiedlichen Medien kultiviert, um die Ausgangsbedingungen für den ELISpot zu verbessern. Hierbei wurden ebenfalls DMEM + 10% FKS und AIM-V getestet. Zur Gewöhnung der Zellen an das neue Medium wurde auch hier in der ersten Passage das neue Medium nur zur Hälfte eingesetzt und zu 50 % DMEM + 10% FKS weitergegeben. In den folgenden Abbildungen sind lichtmikroskopische Aufnahmen der beiden Versuchsansätze zu sehen. Abbildung 5a zeigt die MRC-5 in 100% DMEM + 10% FKS, Abbildung 5b die Zellen in 100% AIM-V.



**Abbildung 5: Vergleich der eingesetzten Medien bei MRC-5.** **a:** MRC-5 wurden in DMEM +10% FKS kultiviert, lichtmikroskopische Aufnahme mit 10-facher Vergrößerung, **b:** dargestellt sind MRC-5 nach der ersten Passage mit 100% AIM-V, lichtmikroskopische Aufnahme mit 10-facher Vergrößerung. Zur Gewöhnung der Zellen an das neue Medium wurden in der ersten Passage 50% DMEM + 10% FKS und 50% AIM-V verwendet.

Im Vergleich zu 5a, in welchem ein recht enger Zellverband mit sichtbaren Kontakten zwischen den einzelnen Zellen zu erkennen ist, ist dieser in 5b deutlich geringer. Teilweise ist eine Abrundung der Zellen bis hin zum Verlust des Kontakts zum Flaschenboden zu beobachten. Auch wenn das AIM-V keine optimalen Bedingungen für die MRC-5-Zellen bietet, wurde zu Gunsten des ELISpot auch hier ein Kompromiss akzeptiert. Das Vorgehen ist hierbei identisch mit dem der Adenoviren (s. 2.2.2.2.).

### **3.1.2. Etablierung der Virusanzucht**

#### **3.1.2.1. Etablierung der Anzucht der Adenoviren**

Zu Beginn der Infektionsreihe war die Dauer, in der ein CPE erkennbar war unter den einzelnen Serotypen sehr unterschiedlich. Der Serotyp 12 benötigte zu Beginn ca. 6 Tage, um sich „durchzusetzen“ und einen vollständigen zytopathischen Effekt zu erzeugen. Erst im weiteren Verlauf, mit steigendem Virustiter, glich der Infektionsverlauf dem der anderen Serotypen. Das AdV-8-1 zeigte anfangs keinerlei Effekt auf die Zellen, wurde dennoch jeweils gemeinsam mit dem Serotyp 12 nach 6 Tagen geerntet. Auch der Virusstamm des AdV-8-2, der aus dem Referenzzentrum Hannover bezogen wurde, infizierte die Zellen nur sehr langsam. Jedoch war bei diesem Stamm nach einigen Tagen ein zytopathischer Effekt erkennbar. Obwohl zum Schluss beide Stämme in der Lage waren, die Zellen zu infizieren, war die dafür benötigte Zeit des AdV-8-2 kürzer, weswegen die weiteren Infektionen mit diesem

Stamm durchgeführt wurden. Bei beiden Viren wurden die Infektionen wie beschrieben fortgesetzt.

Das AdV-11 (B2) war zu Beginn gut in der Lage, die Zellen zu infizieren. Zum Ende der Infektionsreihe war jedoch ein zytopathischer Effekt nicht mehr nachzuweisen und auch in der PCR konnte nur noch ein negatives Ergebnis erzielt werden. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf auf diesen Serotyp verzichtet. Über AdV-34 konnte die Spezies B2 jedoch weiterhin abgedeckt werden.

### **3.1.2.2. Etablierung der Anzucht des VZV**

Die Anzucht des VZV erwies sich als äußerst schwierig und komplikationsreich. Dies lag nicht nur an der langsamen Replikationsrate des VZV, sondern auch an den äußerst empfindlichen HFF-Zellen. Zu Beginn wurden MRC-5-Zellen verwendet, die mit dem Impfstoff Varivax infiziert wurden. Dieses Virus konnte sich jedoch auch nach mehrmaligem Infektionsversuch nicht durchsetzen. In einem neuen Ansatz wurde ein VZV Stamm Oka/Merck von der Arbeitsgruppe Schmidt (s. 2.1.3.) verwendet, mit welchem HFF-Zellen infiziert wurden. In diesem Ansatz gelang es dem Virus, sich zu replizieren. Der Erfolg war jedoch nur durch PCR zu bestätigen, da beim VZV ein zytopathischer Effekt, wie er bei den Adenoviren oder etwa dem HSV-1 zu sehen war, nicht deutlich erkennbar war. Lediglich das Medium zeigte nach einer Inkubationsdauer von 12 Tagen p.i. eine dunklere Färbung. Diese könnte allerdings auch auf den Stoffwechsel der Zellen zurückzuführen sein, sodass hierdurch keine Aussage über den Replikationserfolg gemacht werden konnte. Es gelang, einen PCR-Titer von  $1,4 \times 10^6$  copies/ml im Überstand zu erzielen. Anschließend konnte jedoch keine erfolgreiche Replikation mehr beobachtet werden, sodass im Weiteren mit diesem Titer gearbeitet wurde. Ein Versuch, die HFF-Zellen FKS-freiem Medium auszusetzen wurde nicht durchgeführt, da die HFF-Zellen sich als sehr empfindlich herausstellten und ein Versuch dahingehend im vornherein als wenig erfolgversprechend betrachtet wurde.

### 3.2. Titerbestimmung

#### 3.2.1. Übersicht über die angezüchteten Viren

In der folgenden Tabelle sind alle Viren aufgelistet, die erfolgreich angezüchtet werden konnten.

Virus	PCR-Titer (copies/ml)	Sequenzierung
AdV-1	$1 \times 10^{11}$	100%
AdV-2	$1,2 \times 10^{11}$	100%
AdV-3	$1,0 \times 10^{10}$	99,6%
AdV-4	$4,4 \times 10^{10}$	100%
AdV-5	$8,6 \times 10^{10}$	100%
AdV-6	$1,9 \times 10^{10}$	100%
AdV-7	$2,1 \times 10^{10}$	100%
AdV-8	$4,3 \times 10^7$	100%
AdV-12	$1,5 \times 10^9$	99,6%
AdV-34	$3,3 \times 10^7$	100%
HSV-1	$1,3 \times 10^8$	positiv
VZV	$1,4 \times 10^6$	positiv

**Tabelle 12: Auflistung aller angezüchteten Viren, deren PCR-Titer in „copies/ml“ und Sequenzierungsnachweis.** Die PCR wurde durch die klinische Virologie am Institut für klinische Mikrobiologie und Hygiene durchgeführt. Die Nachweisgrenze für die Adenoviren sowie für das HSV-1 lag bei 300 copies/ml, die Nachweisgrenze für das VZV bei 1000 copies/ml. Die Sequenzierung der Adenoviren erfolgte zum Ausschluss von Kreuzvarianten und erfolgte mit Hilfe der Vergleichsserotypen der NCBI GenBank.



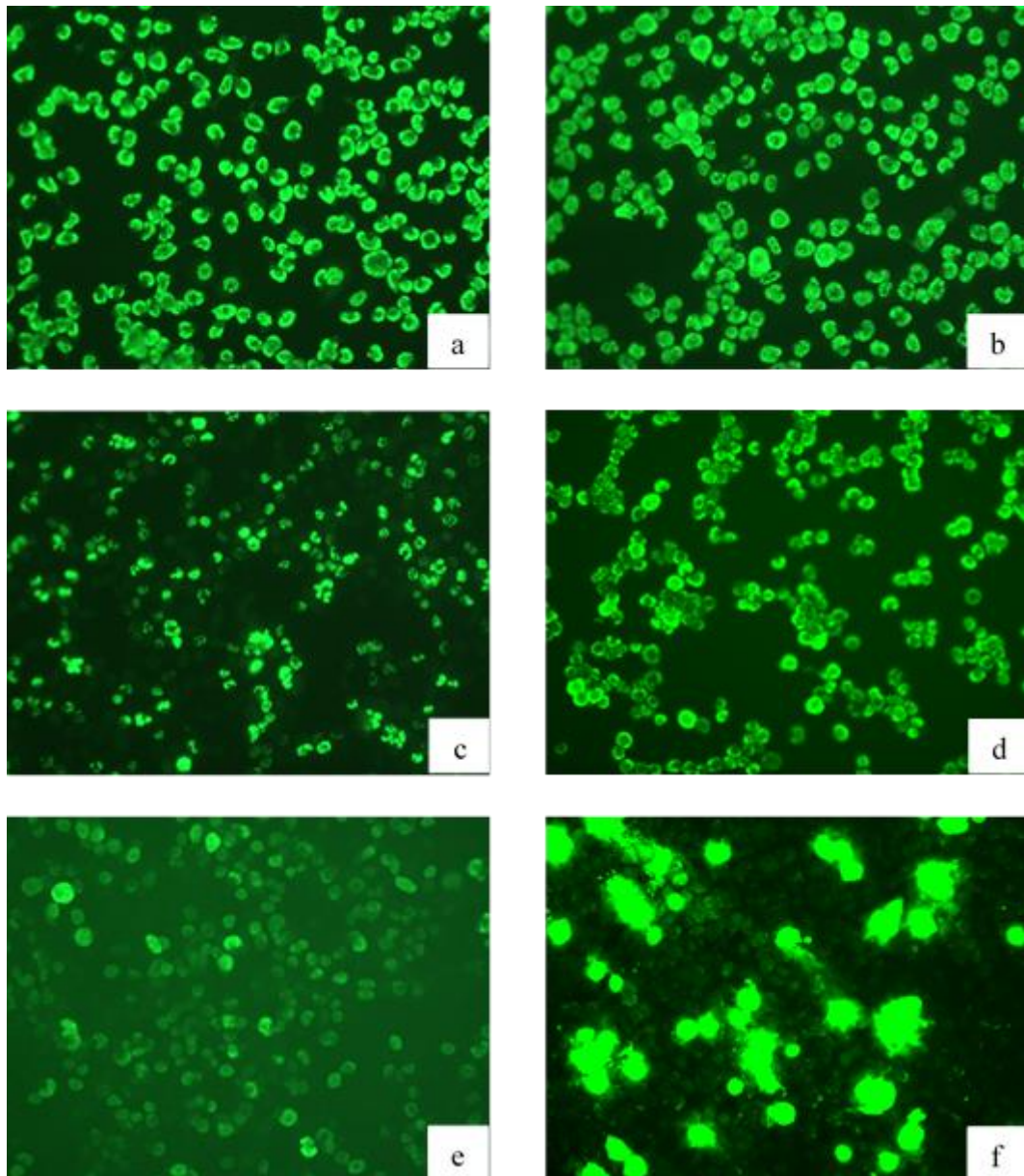
Mittels PCR wurden die Viren sequenziert und deren Titer bestimmt. In der Sequenzierung zeigten 8 von 10 Serotypen des Adenovirus eine 100-prozentige Übereinstimmung mit dem jeweiligen Vergleichsserotyp der NCBI GenBank auf. Zwei Serotypen zeigten eine 99,6-prozentige Übereinstimmung. Hiermit konnten mögliche Kreuzvarianten ausgeschlossen werden. Bei der Sequenzierung des HSV-1 und des VZV wurde in beiden Fällen ein positiver Virusnachweis im Überstand erbracht.

Die untere Nachweisgrenze bei der PCR-Titerbestimmung lag sowohl bei Adenoviren als auch bei Herpes-Simplex-Viren bei 300 copies/ ml. Die Nachweisgrenze für das VZV war bei 1000 Kopien/ ml festgesetzt.

### **3.2.2. Titerbestimmung mittels FFA**

Da der PCR-Titer lediglich die Anzahl der DNA-Kopien feststellt, gibt dies keine genaue Aussage über die Anzahl der tatsächlich replikationsfähigen Viren. Aus diesem Grund wurde für die Adenoviren zusätzlich ein „Focus Forming Assay“ durchgeführt (s 2.2.3.2.).

Positive Ergebnisse wurden für die Serotypen 1-3 sowie 5,6 und 12 erhalten. Aufgrund der vermutlich zu niedrigen Affinität der Primärantikörper gegenüber den restlichen Serotypen war in diesen Fällen eine Auswertbarkeit nicht gegeben. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit den jeweiligen Titern in FFU/ml sind unten aufgeführt.



**Abbildung 6: Titerbestimmung mittels FFA.** Pro Virus wurden H1299-Zellen auf einer 6-Wellplatte ausgesät und mit den Viren in Verdünnungsreihen infiziert ( $10^{-2}$ - $10^{-7}$  für AdV-1 – 4, -12,  $10^1$ - $10^{-5}$  für AdV-5, -6, -8-2,  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  für AdV-7, -34). Nach der Infektion erfolgte die Zugabe von Primär- und fluoreszierendem Sekundärantikörper. Die Auswertung wurde mittels Fluoreszenzmikroskop im GFP-Modus in 20-facher Vergrößerung durchgeführt.

**a:** AdV-1 Verd.  $10^{-2}$ ,  $7,6 \times 10^9$  FFU/ml **b:** AdV-2, Verd.  $10^{-2}$ ,  $2,2 \times 10^9$  FFU/ml **c:** AdV-3, Verd.  $10^{-2}$ ,  $1,1 \times 10^6$  FFU/ml **d:** AdV-5, Verd.  $10^{-2}$ ,  $6,4 \times 10^9$  FFU/ml, **e:** AdV-6, Verd.  $10^{-3}$ ,  $4,4 \times 10^7$  FFU/ml **f:** AdV-12, Verd.  $10^{-4}$ ,  $1,1 \times 10^7$  FFU/ml

Da die Ergebnisse nur von einem Teil der zu testenden Adenoviren vorliegen, wurde fortführend mit dem PCR-Titer gearbeitet. Der FFA wurde weiterhin als Orientierungshilfe zur Abschätzung des tatsächlich vorliegenden Titters genutzt.

### **3.2.3. Titerbestimmung mittels Plaque-Assay**

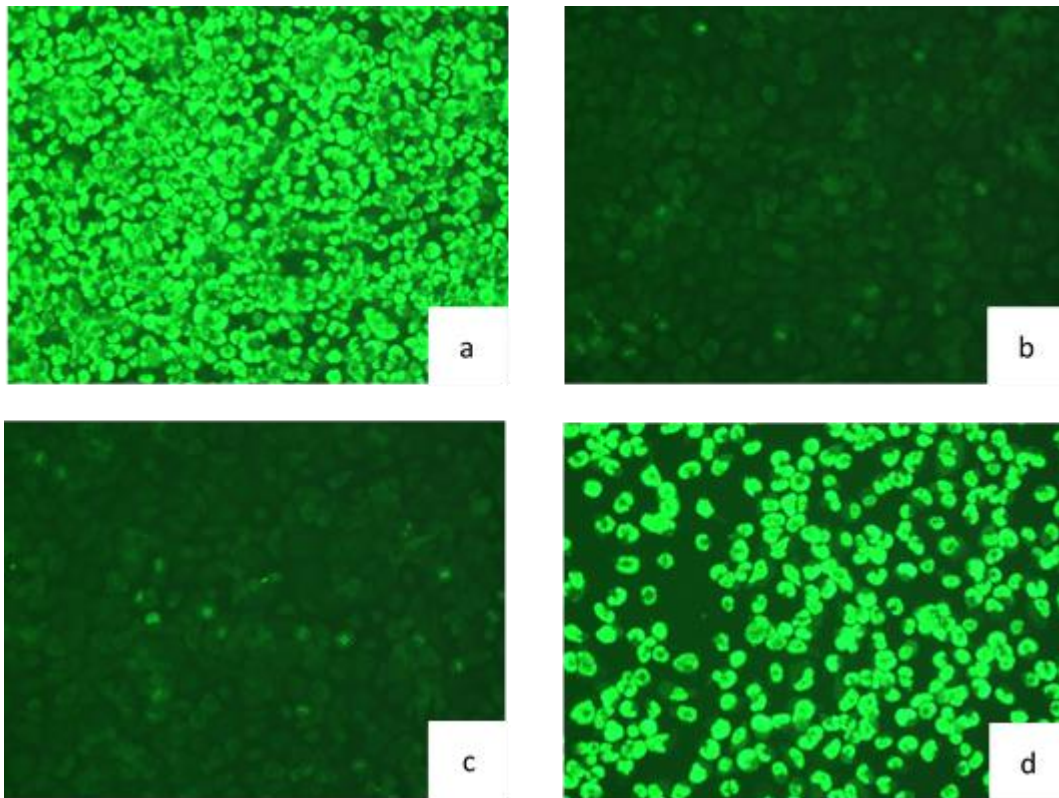
Der Plaque-Assay wurde für das HSV-1 sowie für die in 2.2.3.3. genannten Adenoviren durchgeführt. Hierbei zeigte sich jedoch nur orientierungsweise ein quantitativer Trend. Aus diesem Grund wurden die weiteren Bestimmungen mittels PCR durchgeführt.

### **3.3. Virusinaktivierung**

Um das Arbeiten mit den Viren möglichst risikofrei zu gestalten, war es von Interesse, die Viren im Anschluss an die Anzucht zu inaktivieren. Um das Ergebnis des ELISpots nicht zu beeinflussen oder einzuschränken, musste eine Methode gewählt werden, die das Virus inaktiviert, ohne die immunogenen Aminosäuresequenzen, welche im ELISpot entscheidend sind, zu zerstören. Hierfür wurde die Inaktivierung mittels Hitze der Inaktivierung durch UV-Strahlung gegenübergestellt.

#### **3.3.1. Inaktivierungsversuch der Adenoviren**

In Abbildung 7 sind die einzelnen Ansätze des Inaktivierungsversuchs an AdV-1 im FFA gegenübergestellt. In der in 7a gezeigten Kontrolle wurde ein unbehandeltes Virus mit den Zellen inkubiert. Hier ist eine deutliche Virusreplikation anhand der zahlreichen fluoreszierenden Foci zu erkennen. Die besten Resultate hinsichtlich des Inaktivierungserfolgs wurden somit durch Hitzeinaktivierung (7b) und der Inaktivierung durch den Stratalinker 1800 bei  $2 \times 5000 \mu\text{J}$  (7c) erhalten. Hier sind im FFA keine eindeutigen Foci erkennbar. Somit fand keine effiziente Virusreplikation mehr statt. Im Vergleich hierzu ist eine aktive Proteinexpression des Virus in Abbildung 7d festzustellen, welche ein ungenügendes Ergebnis nach Inaktivierung mit dem Stratalinker 2400 darstellt. Hier weist der fluoreszierende Zellrasen, verglichen mit der Kontrolle zwar deutliche Lücken auf, eine vollständige Virusinaktivierung hat aber offensichtlich nicht stattgefunden, sodass die Viren auch nach der UV-Bestrahlung noch in der Lage waren, viruseigene Proteine zu bilden.

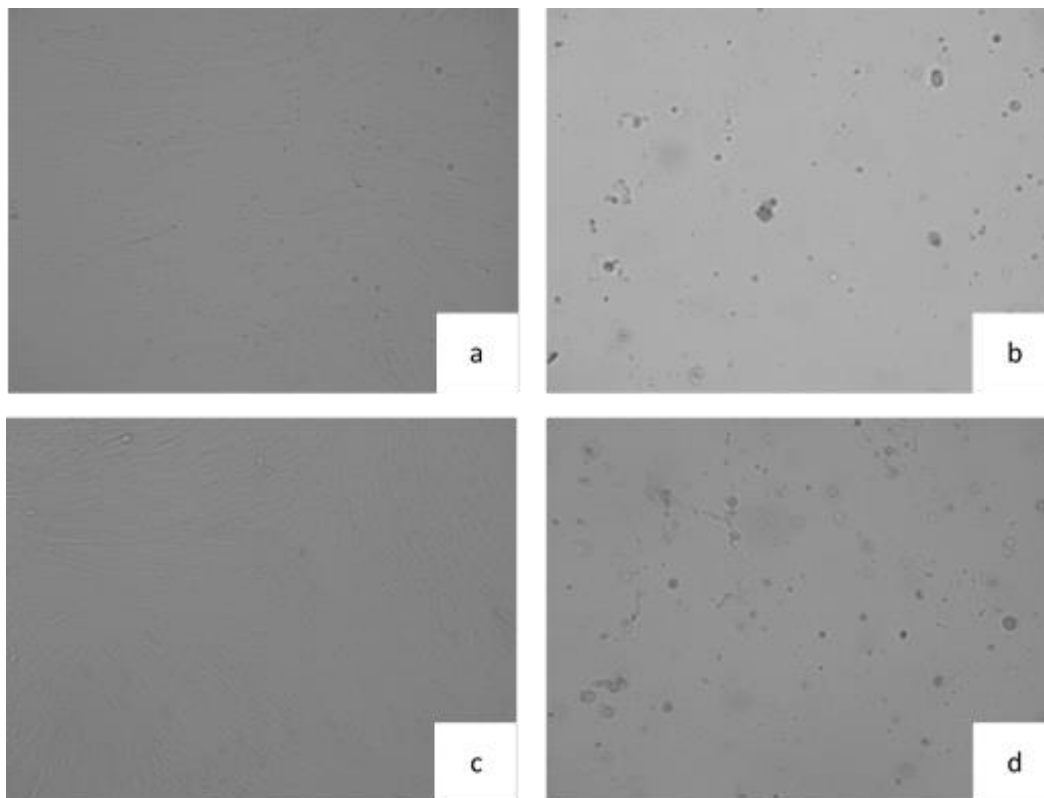


**Abbildung 7: Inaktivierungsversuch der Adenoviren.** Die Überprüfung des Inaktivierungserfolges wurde exemplarisch anhand des AdV-1 mittels FFA durchgeführt.

**a:** Positivkontrolle mittels Infektion der Zellen mit unbehandeltem Virus **b:** Inaktivierung des Virus bei 70°C über 30 Minuten **c:** Inaktivierung des Virus mittels Stratalinker 1800 mit 2×5000 µJ **d:** Inaktivierung des Virus mittels Stratalinker 2400 mit 2×5000 µJ  
Verdünnung 10<sup>-9</sup>, 20-fache Vergrößerung

### 3.3.2. Inaktivierungsversuch des HSV-1 mittels UV

Wie beim AdV-1 fällt auch im Falle des HSV-1 das Ergebnis zu Gunsten des Stratalinkers 1800 aus (8c). Die Zellen sind hier vergleichbar mit der Negativkontrolle (8a), bei der weiterhin ein dichter Zellrasen erkennbar ist, welcher fest am Flaschenboden haftet. Die pathogenen Strukturen wurden somit offensichtlich zerstört und eine Replikation mit anschließender Lyse der Zellen konnte nicht mehr stattfinden. Das Resultat nach Inaktivierung mit dem Stratalinker 2400 (8d) ist wiederum zu vergleichen mit der Positivkontrolle (8b), bei welcher ein deutlicher zytopathischer Effekt eingetreten ist und die Zellen keine Haftung mehr am Flaschenboden besitzen. Eine adäquate Inaktivierung, welche die Replikationsfähigkeit des Virus verhindert, konnte hier somit ebenso wenig erbracht werden, wie im Falle des AdV-1.



**Abbildung 8: Inaktivierungsversuch des HSV-1 mittels UV.** Die Überprüfung des Inaktivierungserfolges erfolgte anhand der Infektion von MRC-5-Zellen.

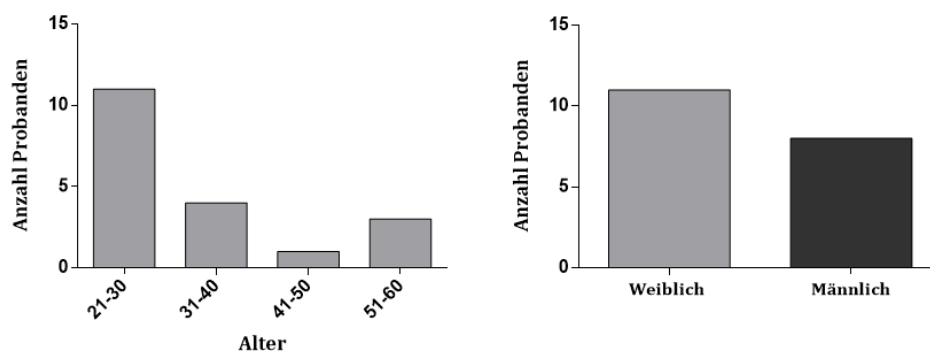
**a:** Negativkontrolle **b:** Positivkontrolle mittels Infektion der Zellen mit unbehandeltem Virus **c:** Inaktivierung des HSV-1 mittels Stratalinker 1800 mit  $2 \times 5000 \mu\text{J}$  **d:** Inaktivierung des HSV-1 mittels Stratalinker 2400 mit  $2 \times 5000 \mu\text{J}$

Verdünnung  $10^{-7}$ , 10-fache Vergrößerung

### 3.4. Auswertung des ELISpot

#### 3.4.1. Alters- und Geschlechterverteilung der Probanden

Die Alters- und Geschlechterverteilung der 19 Probanden sind in Abbildung 9 a und b dargestellt.



**Abbildung 9: a:** Altersverteilung **b:** Geschlechterverteilung der 19 Probanden.

Elf Probanden waren zwischen 21 und 30 Jahre alt, vier zwischen 31 und 40, ein Proband lag in der Altersgruppe von 41 und 50 und drei zwischen 51 und 60 Jahren. Von den 19 Probanden waren zwölf weiblich und sieben männlich.

### **3.4.2. Ergebnisse ELISpot**

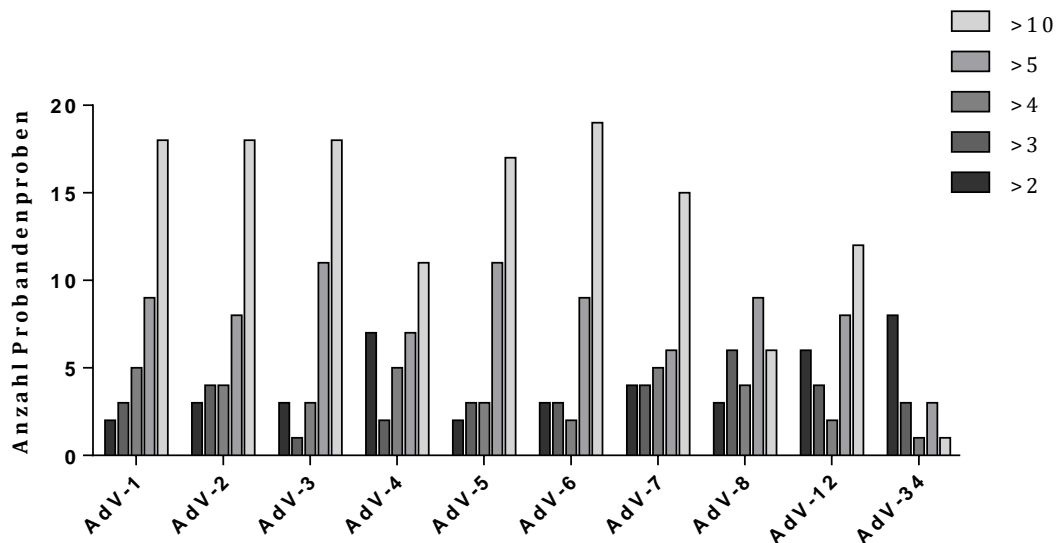
#### **3.4.2.1. Auswertung der Ergebnisse**

Die Auswertung der Versuche erfolgte über Auszählung der Spots im Sinne von Spot Forming Cells (SFC)/  $2 \times 10^5$  Zellen, Bildung eines Mittelwerts der drei Versuchsansätze und Bereinigung durch die Negativkontrolle. Als positiv wurde ein Ergebnis gewertet, wenn die mittlere Zahl an SFC mindestens das Doppelte der Negativkontrolle betrug.

Für die Gesamtauswertung wurden die SFC als Signalthöhe aller positiv gewerteten Resultate ermittelt und in mehrere Stufen eingeteilt. Diese stellen jeweils ein Vielfaches der NK dar. Die Stufen schließen alle Werte ein, welche zwischen der jeweilig genannten und der darüberliegenden liegen. Für eine zweimal höhere Signalstufe gilt somit:  $\geq 2$  und  $< 3$ . Insgesamt wurden alle positiven Ergebnisse miteinberechnet. Der Erst- und Wiederholungsversuch wurden unabhängig voneinander betrachtet, sodass die Ergebnisse beider Zeitpunkte in diese Auswertung einfließen. Es ergibt sich somit für diesen Teil der Ergebnisdarstellung eine Versuchsanzahl pro Virus von  $N=38$ . Anschließend wurden zudem die Ergebnisse beider Versuchsdurchgänge der 19 Probanden ausgewertet und auf ihre Übereinstimmung überprüft. Als positiv gilt ein Ergebnis, wenn der Proband in beiden Versuchen positiv hinsichtlich des jeweiligen Virus reagierte. Wurde beide Male ein negatives Ergebnis erzielt, wird das Gesamtergebnis als negativ gewertet. Ein diskrepantes Ergebnis liegt vor, wenn widersprüchliche Ergebnisse, also ein positives und ein negatives vorzufinden waren. Eindeutig positive und eindeutig negative Ergebnisse werden im Folgenden in der Gesamtheit als übereinstimmende Ergebnisse in Prozent angegeben.

##### **3.4.2.1.1. Gesamtauswertung Adenoviren**

Anhand Abbildung 10 wird ersichtlich, dass die Adenoviren in der Lage sind, eine hohe Signalthöhe im ELISpot zu induzieren.



**Abbildung 10: Anzahl der Probandenproben in Abhängigkeit von der jeweiligen Signalthöhe hinsichtlich der verschiedenen Serotypen des Adenovirus im ELISpot.** Für die Gesamtauswertung wurden die SFC aller positiv gewerteten Resultate ermittelt. Bei 19 Probanden zu 2 Zeitpunkten ergibt sich eine Versuchsanzahl pro Virus von N=38. Ein positives Resultat ist definiert als der Mittelwert an SFC einer Probe pro Virus, welcher mindestens das Doppelte der Negativkontrolle beträgt. Anschließend erfolgte die Einteilung der positiven Ergebnisse in fünf Stufen, bezogen auf die Signalthöhe zur Negativkontrolle.

AdV-1 bis -3 sowie -5 bis -7 erreichten zum einen sehr ähnliche Ergebnisse, zum anderen wiesen bei diesen Serotypen eine hohe Anzahl von Proben eine Menge an SFC auf, die zehnmal höher lag, als im Vergleich zur NK. Bei den Serotypen 1-3 waren es jeweils 18, bei 5 17, bei 7 15 und bei Serotyp 6 sogar 19 Probandenproben. Insgesamt lässt sich bei diesen Serotypen feststellen, dass mit steigender Signalthöhe auch die Zahl der Proben stieg, welche diese Signalthöhe erreicht haben. So wiesen die Stufen 2-4 bei allen genannten Serotypen deutlich weniger positive Proben auf, als die Stufen 5 und 10. Bei keinem der Viren reagierten mehr als vier Proben mit einer nur 2-fachen Signalthöhe. Ähnlich verhielten sich AdV-4 und AdV-12. Jedoch waren es in diesen Fällen nur etwas mehr als zehn Probandenproben mit einer Signalthöhe höher als das zehnfache, während jeweils mehr als fünf eine zweifach höhere Antwort zeigten. Auch bei AdV-8 fiel das Ergebnis nicht so deutlich aus wie bei den anfangs genannten Serotypen. Hier lag die höchste Probenzahl mit neun bei einer fünffach höheren Anzahl an SFC. Die Resultate für die übrigen Signalthöhen lag hier nahe beieinander, mit zwischen drei und sechs Proben pro Stufe. Auffallend ist das abweichende Ergebnis bei AdV-34, bei dem ein entgegengesetztes Gesamtergebnis zu



beobachten war. Mit acht Proben lag der höchste Wert bei  $\geq 2$ , während nur eine Probe eine Menge an SCF aufwies, die mehr als das Zehnfache der NK betrug.

In Tabelle 13 ist die Auswertung der Ergebnisse hinsichtlich ihrer Übereinstimmung zu beiden Zeitpunkten dargestellt.

	<b>übereinstimmende Ergebnisse (in %)</b>	<b>Positive Ergebnisse</b>	<b>Negative Ergebnisse</b>	<b>Diskrepante Ergebnisse</b>
<b>AdV-1</b>	94,7	18	0	1
<b>AdV-2</b>	94,7	18	0	1
<b>AdV-3</b>	94,7	18	0	1
<b>AdV-4</b>	68,4	13	0	6
<b>AdV-5</b>	89,5	17	0	2
<b>AdV-6</b>	94,7	18	0	1
<b>AdV-7</b>	89,5	16	1	2
<b>AdV-8</b>	78,9	12	3	4
<b>AdV-12</b>	89,5	15	2	2
<b>AdV-34</b>	57,9	3	8	8

**Tabelle 13: Vergleich der Ergebnisse der Probanden zu beiden Zeitpunkten hinsichtlich aller getesteten Serotypen.** Die Ergebnisse beider Versuchsdurchgänge wurden auf ihre Übereinstimmung überprüft und in positive, negative sowie diskrepante Ergebnisse eingeteilt. Als positiv gilt ein Ergebnis, wenn ein Proband in beiden Versuchsdurchgängen positiv auf einen Serotypen reagierte. Ein negatives Ergebnis liegt bei einem negativen Resultat zu beiden Zeitpunkten vor. Bei Vorliegen sowohl eines positiven als auch eines negativen Ergebnisses bezüglich eines Serotypen, wurde das Ergebnis als diskrepant gewertet. Positive und negative Ergebnisse werden als übereinstimmende Ergebnisse bezeichnet und in Prozent angegeben. Es gilt: N=19.

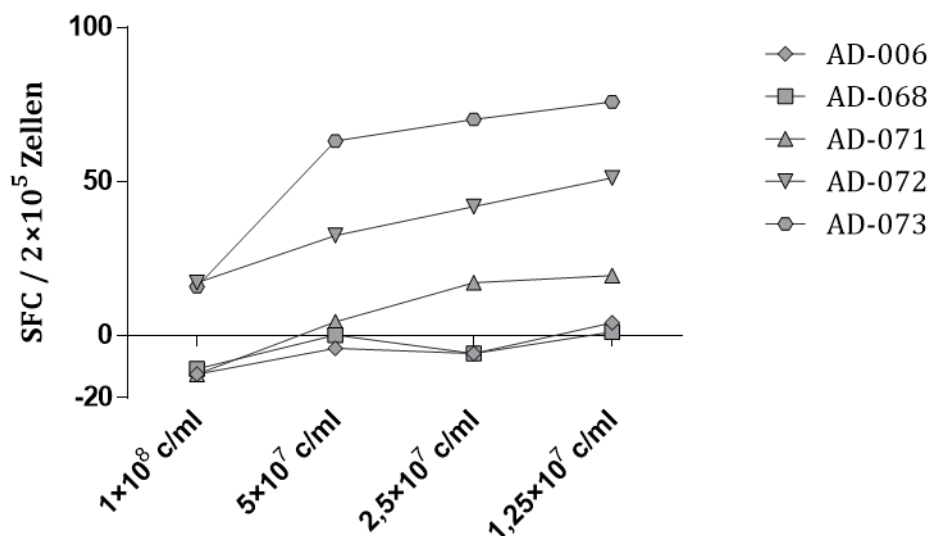
Bei AdV-1, -2, -3 und -6 lagen identische Ergebnisse vor. In 94,7 Prozent stimmten die Ergebnisse beider Durchgänge überein, wobei 18 Probanden ein positives Ergebnis zeigten und jeweils ein Proband ein diskrepantes. Kein Proband wurde negativ getestet. Ein ähnliches Resultat sah man bei AdV-5, -7 und -12. 89,5% der Probanden zeigten hier übereinstimmende Ergebnisse. Auch hier wurde der überwiegende Teil der Studienpopulation positiv gewertet. In jeweils zwei Fällen lagen diskrepante Ergebnisse vor. Ein Proband reagierte negativ auf AdV-7, zwei Probanden negativ auf AdV-12. Weniger eindeutige Ergebnisse wurden bei AdV-4 und AdV-8 erzielt. Nur 68,4%, bzw. 78,9% waren bei beiden Versuchsdurchgängen vergleichbar. Bei AdV-4 standen 13 eindeutig positiv gewerteten Probanden sechs diskrepante gegenüber.



Zwölf Probanden waren bei AdV-8 positiv, drei negativ und vier wiesen ein diskrepantes Ergebnis auf. Insgesamt überwogen die eindeutig positiven Ergebnisse deutlich gegenüber den eindeutig negativen und den diskrepanten. Abweichend hiervon war der Serotyp 34, auf welchen nur drei Probanden mit einem eindeutig positiven Ergebnis reagierten. Acht hingegen zeigten ein negatives und acht Studienteilnehmer ein diskrepantes Ergebnis. Dementsprechend waren hier nur 57,9% im Gesamtergebnis übereinstimmend.

#### **3.4.2.1.2. Ermittlung des optimalen Titers des AdV-12**

Wie in 2.2.5. beschrieben, wurde versucht, möglichst viele Serotypen des Adenovirus mit derselben Konzentration im ELISpot einzusetzen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurde auch das AdV-12 zu Beginn der Versuchsdurchführungen mit einem PCR-Titer von  $10^8$  c/ml eingesetzt, bei einem Ausgangstiter von  $1,5 \times 10^9$  c/ml. Dies hatte zur Folge, dass die Verdünnungsstufe nur 1:10 betrug und dementsprechend mit 67 µl/Well eine große Menge Virussuspension eingesetzt werden musste. Abgesehen von dem hohen Verbrauch an Virus musste zudem festgestellt werden, dass die Signalthöhe deutlich unter der der restlichen Serotypen lag und überdurchschnittlich häufig negativ ausfiel, auch im Vergleich zu den anderen selteneren Serotypen. Diese Ergebnisse gaben Grund zur Annahme, dass das Medium, in welchem das AdV-12 vorliegt, sich negativ auf das Resultat im ELISpot auswirkte. Aus diesem Grund wurde anhand von 5 Probanden eine Konzentrationsreihe durchgeführt, in welcher die ursprünglich eingesetzte Konzentration drei weiteren gegenübergestellt wurde, die in jedem Schritt halbiert wurden.



**Abbildung 11: Konzentrationsreihe des AdV-12.** Es wurde eine Konzentrationsreihe mit vier Verdünnungsstufen des AdV-12 hergestellt und anhand der 5 Probanden AD-006, AD-068 und AD-071- bis -073 im ELISpot getestet. Es handelt sich bei den SFC um Mittelwerte abzüglich der Negativkontrolle, sodass die Ergebnisse auch im negativen Bereich liegen können. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Signalthöhe von der jeweiligen im ELISpot eingesetzten Viruskonzentration.

In Abbildung 11 ist der Mittelwert der ausgezählten Spotzahl in Abhängigkeit vom eingesetzten Virustiter gezeigt. Hieraus wird deutlich ersichtlich, dass mit sinkendem Titer die Signalthöhe ansteigt. Bei einer Menge von 8,3 µl an AdV-12- Suspension, welche einem Titer von  $1,25 \times 10^7$  c/ml entspricht, lag die Spotzahl gegenüber dem ursprünglich verwendeten Titer von  $1 \times 10^8$  c/ml bei allen getesteten Probanden mindestens um den Faktor 2,12 höher. Ein Proband erreichte eine Steigerung um das 4,75-fache. Als Konsequenz auf dieses Ergebnis wurde das AdV-12 in den weiteren Versuchen mit einem Titer von  $1,25 \times 10^7$  c/ml im ELISpot eingesetzt.

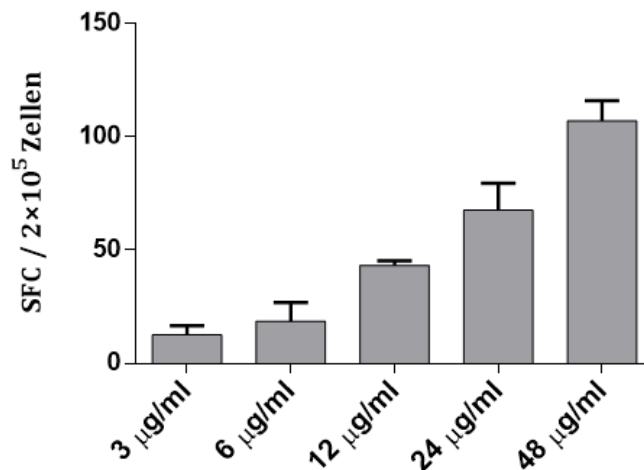
### 3.4.2.1.3. Auswertung der rekombinanten Hexonproteine

#### 3.4.2.1.3.1. Ermittlung der optimalen Konzentration

Wie bei AdV-12, galt es zu Beginn auch bei den rekombinanten Hexonproteinen, die optimale Konzentration für den ELISpot zu finden. Hierzu wurden für beide Proteine Konzentrationsreihen durchgeführt. Die getesteten Konzentrationen orientierten sich an den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers.

### 3.4.2.1.3.2. Hexon 2

Für das Hexon 2 wurde ein Proband herangezogen, welcher bezüglich dessen in einem Vorversuch ein Ergebnis mit hoher Spotzahl im ELISpot zeigte. Fünf Konzentrationen wurden getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

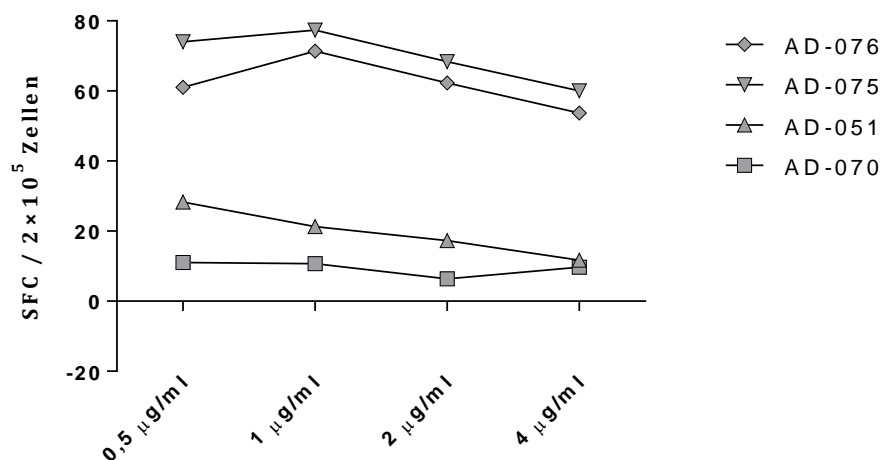


**Abbildung 12: Konzentrationsreihe des Hexon 2.** Eine Konzentrationsreihe mit fünf Verdünnungsstufen wurde anhand eines Probanden, welcher in einem Vorversuch positiv auf das Hexon 2 reagierte, im ELISpot getestet. Es handelt sich bei den SFC um Mittelwerte abzüglich der Negativkontrolle. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Menge an SFC von den jeweiligen im ELISpot eingesetzten Konzentrationen.

Anhand des Graphen ist zu erkennen, dass mit steigender Konzentration auch die erzeugte Signalthöhe ansteigt und einen linearen Verlauf zeigt ( $y = 0,4862x - 6,2676$ ,  $R^2 = 0,971$ ). Die Signalthöhe bei einer Konzentration von 48 µg/ml lag mit 107 SFC um den Faktor 8,5 höher als bei einer Konzentration von 3 µg/ml, mit einer mittleren Spotzahl von 12,6 und um den Faktor 5,75 höher, als bei 6 µg/ml mit 18,6 SFC. Auch bei einer Konzentration von 24 µg/ml war die Spotzahl mit 67,6 hoch. Dies lässt den naheliegenden Schluss zu, eine höhere Konzentration wie etwa 24 µg/ml oder 48 µg/ml für den ELISpot einzusetzen. Mit Rücksicht auf die Kosteneffizienz und den Ressourcenverbrauch waren diese Mengen allerdings nicht relevant. Aufgrund der Angaben des Herstellers, welcher eine Konzentration von 6 µg/ml empfiehlt und auf Basis der Literatur [34, 97], wurde entschieden, diese Konzentration für die Studie einzusetzen.

### 3.4.2.1.3.3. Hexon 5

Für das Hexon 5 wurden an vier Probanden vier verschiedene Konzentrationen getestet. Die Ergebnisse waren hier nicht so eindeutig, wie im Falle des Hexon 2. Hier zeigte sich eine Tendenz, dass mit steigender Konzentration die Spotzahl absank. Zudem zeigte sich bei den Probanden AD-075 und Ad-076 ein leichter Peak bei der Konzentration 1 µg/ml. So erreichten sie bei dieser Konzentration eine mittlere Spotzahl von 77,3 und 71,3 gegenüber 74 und 61 SFC bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml. Bei der höchsten Konzentration, 4 µg/ml, erreichten sie lediglich 60 und 53,6 SFC. Die Probanden AD-051 und AD-070 zeigten die höchste Spotzahl bei der niedrigsten Konzentration mit 28,3 und 11 SFC. Darauf folgte die zweitniedrigste Konzentration mit 21,3 und 10,6 SFC im Mittel. Den niedrigsten Wert mit 6,3 Spots erreichte AD-070 bei 2 µg/ml, wobei die Spotzahl bei der höchsten Konzentration mit 9,6 nur leicht darüberlag. AD-051 hatte das niedrigste Ergebnis, wie die Probanden AD-075 und AD-076, bei einer Konzentration von 4 µg/ml mit 11,6 Spots.



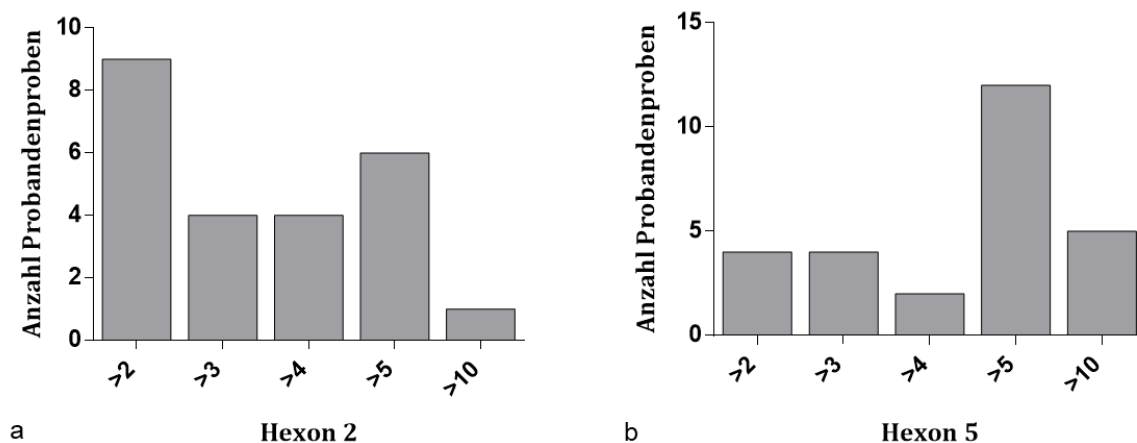
**Abbildung 13: Konzentrationsreihe des Hexon 5.** Eine Konzentrationsreihe des Hexon 5 wurde hergestellt und anhand der vier Probanden AD-075, -076, -051 und -070 im ELISpot getestet. Es handelt sich bei den SFC um Mittelwerte abzüglich der Negativkontrolle. Gezeigt ist die Abhängigkeit der Menge an SFC von den im ELISpot eingesetzten Konzentrationen.

Auch für das Hexon 5 wurde bei der Wahl der optimalen Konzentration die Empfehlung des Herstellers berücksichtigt, welche die Konzentration 1 µg/ml zur Stimulation von T-Zellen im ELISpot angibt. Da auch die Ergebnisse hierfür in der Konzentrationsreihe zufriedenstellend waren, wurde diese Konzentration für die ELISpot-Studie gewählt.

### 3.4.2.1.3.4. Gesamtauswertung Hexonproteine

Für die Gesamtauswertung des Hexon 2 wurden die Ergebnisse von 19 Probanden (N=38) ausgewertet (s. Abb. 14a). Neun Proben wiesen eine Signalthöhe auf, welche zweimal so hoch war wie die NK. Jeweils vier Probandenproben zeigten eine dreifach, bzw. vierfach höhere Spotzahl. Eine fünffach höhere Menge an SFC wurde bei sechs Proben festgestellt, nur ein Ansatz erzielte eine Signalthöhe, die mehr als das Zehnfache gegenüber der NK betrug.

Im Falle des Hexon 5 wurden 15 Probanden (N=30) in die Ergebnisauswertung aufgenommen (s. Abb. 14b). Hier lag der Peak bei einer fünffach höheren Spotzahl, mit zwölf Proben. Mit fünf Proben lag das zweithöchste Ergebnis bei einem mehr als zehnfach höheren Signal. Jeweils vier Resultate wiesen eine zweifach oder dreifach höhere Zahl an SFC auf und in nur zwei Proben reagierten Probanden mit einer vierfach höheren Antwort.



**Abbildung 14: Anzahl an Probandenproben in Abhängigkeit von der jeweiligen Signalthöhe im ELISpot hinsichtlich Hexon 2 und Hexon 5.** Alle positiven Ergebnisse der beiden Versuchsdurchgänge wurden einberechnet und die Signalthöhe als Vielfaches der Negativkontrolle in 5 Stufen eingeteilt **a:** Für das Hexon 2 wurden die Ergebnisse von 19 Probanden einberechnet, sodass gilt: N=38. **b:** Für das Hexon 5 wurden die positiven Ergebnisse beider Versuchsdurchgänge von 15 Probanden einberechnet, es gilt also: N=30.

Wie bei den Adenoviren wurden die Ergebnisse beider Versuchsdurchgänge verglichen.

Aus der Studienpopulation des Hexon 2 erzielten 68,4% der Probanden ein übereinstimmendes Ergebnis. Davon waren neun positiv und vier negativ. Sechs Probanden wiesen ein diskrepantes Ergebnis auf.

Von den 15 Probanden, welche auf das Hexon 5 getestet wurden, zeigten 93,3% ein übereinstimmendes Ergebnis. Hiervon waren 13 positiv und nur eines negativ. Ebenso gab es auch hier nur ein diskrepantes Ergebnis.

	übereinstimmende Ergebnisse (in %)	Positive Ergebnisse	Negative Ergebnisse	Diskrepante Ergebnisse
Hexon 2	68,4	9	4	6
Hexon 5	93,3	13	1	1

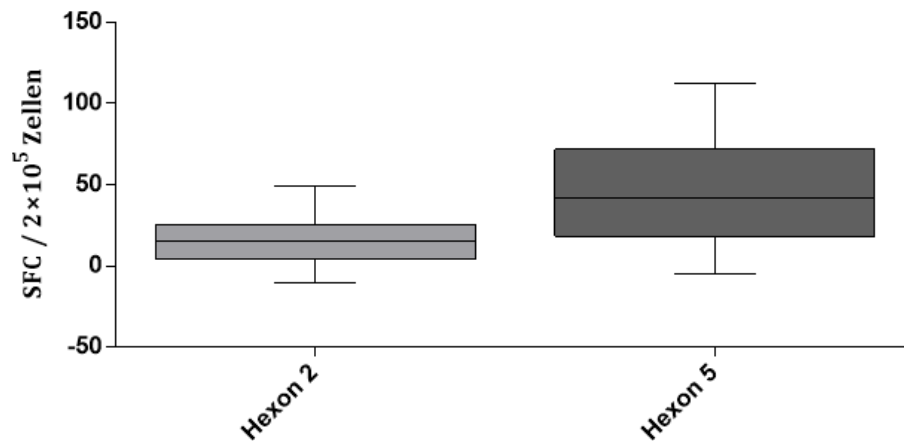
**Tabelle 14: Vergleich der Ergebnisse der Probanden zu beiden Zeitpunkten hinsichtlich Hexon 2 und Hexon 5 im ELISpot.** Die Ergebnisse beider Versuchsdurchgänge wurden auf ihre Übereinstimmung überprüft und in positive, negative sowie diskrepante Ergebnisse eingeteilt. Positive und negative Ergebnisse werden als übereinstimmende Ergebnisse bezeichnet und in Prozent angegeben. Für das Hexon 2 gilt: N=19, für das Hexon 5: N=15.

#### 3.4.2.1.4. Vergleich von Hexon 2 und Hexon 5

Beide Proteine wurden an 15 Probanden getestet und verglichen. Die Daten wurden hierfür von beiden Versuchsdurchgängen einberechnet, wodurch sich eine Versuchszahl von N=30 ergibt.

Der Median des Hexon 2 lag mit 14, 8 deutlich niedriger als der des Hexon 5, welcher sich bei 42 befand. Die Ergebnisse des Hexon 2 waren wiederum symmetrischer verteilt und auch die Streuung der Daten waren wesentlich geringer. Der Quartilsabstand betrug 20,3, wobei der Minimalwert -10,7 betrug und der Maximalwert 49, sodass die Spannweite bei 59, 7 lag.

Im Falle des Hexon 5 war die Streuung der Daten mit einem Quartilsabstand von 52,3 wesentlich größer und auch die Spannweite war mit 117,7 fast doppelt so groß wie die des Hexon 2. Der Minimalwert des Hexon 5 lag bei -5, das Maximum bei 112,7 und lag somit um 63,7 SFC höher. Im Boxplot ist zudem zu erkennen, dass die Verteilung der Daten im Falle des Hexon 2 regelmäßiger war, als die des Hexon 5, bei welchem eine Rechtsschiefe festzustellen war.

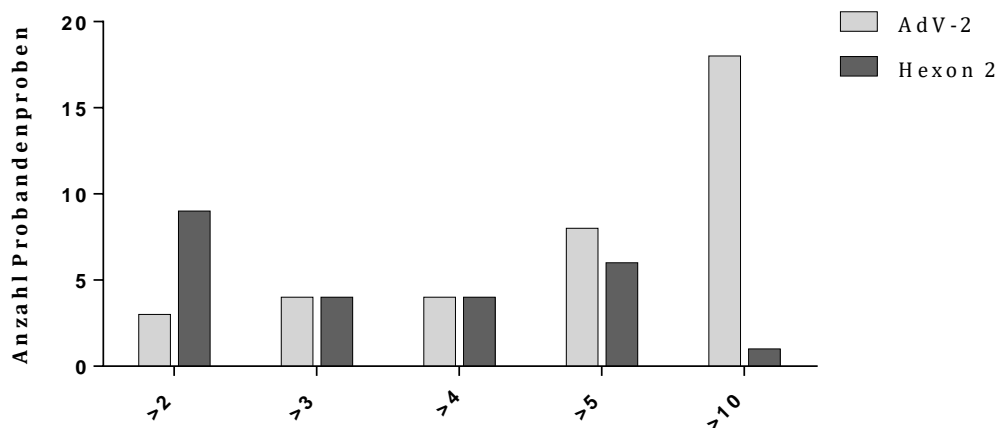


**Abbildung 15: Vergleich von Hexon 2 und Hexon 5.** Die rekombinanten Proteine wurden an 15 Probanden im ELISpot getestet und die Signalhöhen aller Probanden in beiden Versuchsdurchgängen hinsichtlich der beiden Proteine verglichen, sodass gilt: N=30. Es handelt sich bei den SFC um Mittelwerte abzüglich der Negativkontrolle, sodass die Ergebnisse auch im negativen Bereich liegen können. Dargestellt ist ein Boxplot über die Verteilung der Werte.

### 3.4.2.1.5. Vergleich von Adenovirus und Hexon

#### 3.4.2.1.5.1. Vergleich von AdV-2 und Hexon 2

Für diesen Vergleich wurden alle Ergebnisse der 19 Probanden zu beiden Zeitpunkten verglichen. Die Versuchsanzahl betrug somit N=38.

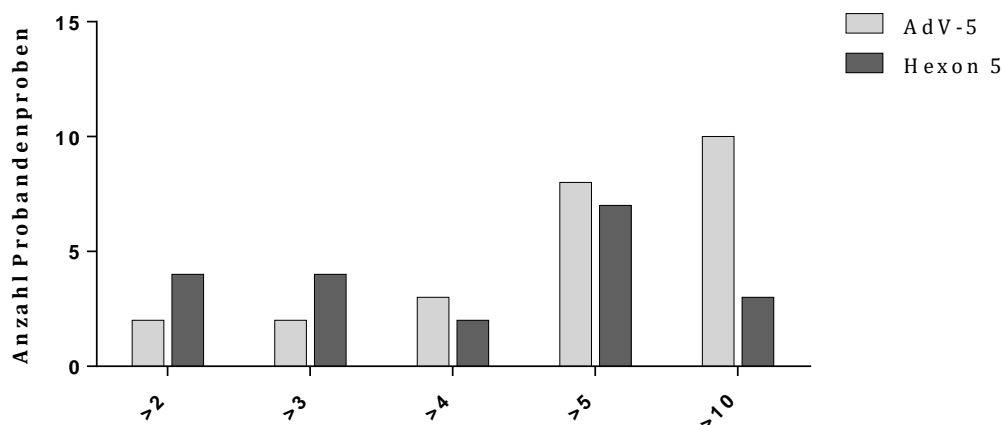


**Abbildung 16: Vergleich von AdV-2 und Hexon 2 im ELISpot.** Dargestellt ist die Anzahl der Probandenproben in Abhängigkeit von der jeweiligen Signalhöhe im ELISpot hinsichtlich AdV-2 und Hexon 2. Hierfür wurden die Ergebnisse des Virus und des Proteins beider Versuchsdurchgänge als Vielfaches der Negativkontrolle in 5 Stufen eingeteilt und miteinander verglichen. Es gilt bei 19 Probanden: N=38.

Im Vergleich des AdV-2 als Gesamtantigen und des rekombinanten Hexon 2 wurde besonders bei den großen Signalhöhen mit einer mehr als zehnfach höheren Spotzahl ein deutlicher Unterschied sichtbar. Das AdV-2 stand hier mit 18 Proben, dem Hexon 2 mit lediglich einer gegenüber. Auch bei einer fünffach höheren Signalantwort gab es mehr positive Resultate bei AdV-2 mit acht, als beim Hexon 2 mit sechs Proben. Ein umgekehrtes Resultat zeigte sich wiederum bei der niedrigsten Signalhöhe, mit welcher neun Proben auf das Hexon 2 reagierten, wohingegen das AdV-2 in nur drei Proben eine derartige Antwort auslöste. In den mittleren Signalhöhen waren beide Antigene vergleichbar. Jeweils vier Proben zeigten eine dreifach und vierfach höhere Menge an SFC im Vergleich zur NK.

#### 3.4.2.1.5.2. Vergleich von AdV-5 und Hexon 5

Für den Vergleich des AdV-5 und Hexon 5 wurden die Ergebnisse beider Zeitpunkte von 15 Probanden verglichen. Hiermit lag die Versuchsanzahl bei N=30.



**Abbildung 17: Vergleich von AdV-5 und Hexon 5.** Dargestellt ist die Anzahl der Probandenproben in Abhängigkeit von der jeweiligen Signalhöhe im ELISpot hinsichtlich AdV-5 und Hexon 5. Hierfür wurden die Ergebnisse des Virus und des Proteins beider Versuchsdurchgänge als Vielfaches der Negativkontrolle in 5 Stufen eingeteilt und miteinander verglichen. Einbezogen wurden 15 Probanden, sodass gilt: N=30.

Auch in diesem Vergleich war das Virus als Gesamtantigen dem rekombinanten Protein überlegen. Mit zehn gegenüber drei Probandenproben, welche eine mehr als zehnmals größere Signalhöhe aufwiesen, lag das AdV-5 deutlich über dem Hexon 5. Bei den niedrigeren Signalhöhen waren die Unterschiede nicht so deutlich, jedoch war das Hexon 5 hier mit mehr positiv getesteten Proben vertreten, als das AdV-5. Erst ab



einer vierfachen Signalthöhe zeigten wieder mehr Proben diese Antwort auf Kontakt mit dem AdV-5 als mit dem Hexon 5. So standen hier drei Probandenproben zwei gegenüber. Bei einer fünffachen Signalthöhe waren es acht Proben bei AdV-5 und sieben beim Protein.

### **3.4.2.1.6. Inaktivierung**

#### **3.4.2.1.6.1. Inaktivierung mittels Hitze**

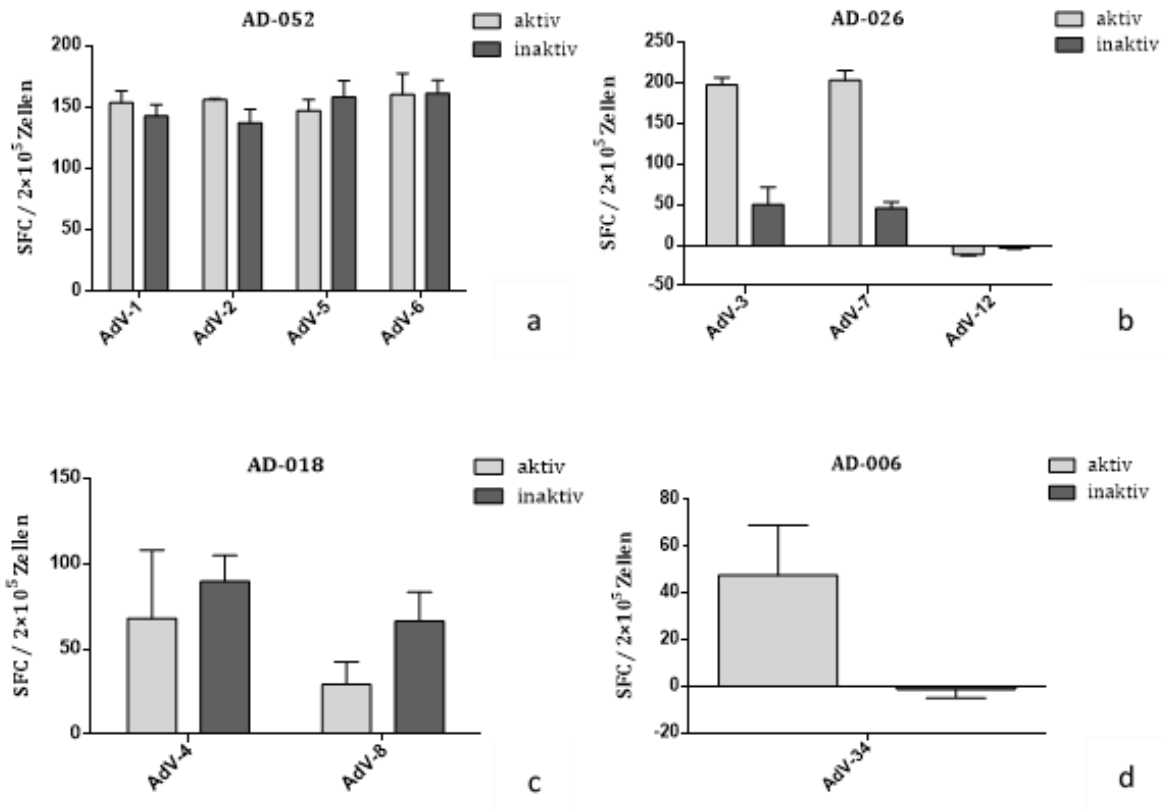
Um herauszufinden, inwiefern sich die Inaktivierung der Adenoviren mit Hilfe von Hitze auf das Ergebnis im ELISpot auswirkt, wurden in einem Vorversuch Probanden mit inaktivierten Viren getestet, welche zuvor ein eindeutig positives Ergebnis auf die jeweiligen Serotypen im ELISpot gezeigt hatten. Die Viren wurden wie in 2.2.4.1. beschrieben inaktiviert.

Die Serotypen 1,2,5 und 6 wurden an Proband AD-052 erneut getestet (s. Abb. 18a). Hier waren nur minimale Unterschiede zwischen der replikationsfähigen und der inaktivierten Form erkennbar. Das AdV-5 erzeugte in der inaktivierten Form etwas mehr Spots als die Unbehandelte. Da die Unterschiede allesamt sehr gering waren, wurden diese Ergebnisse als vergleichbar gewertet.

An AD-026 wurden die Serotypen 3,7 und 12 getestet. In diesem Fall unterlag die inaktivierte Form der Serotypen 3 und 7 dem replikationsfähigen Virus in der Höhe der SFC, mit einem Unterschied von jeweils ca. 150 Spots. Das Ergebnis fiel jedoch weiterhin eindeutig positiv aus. Das hitzeinaktivierte AdV-12 zeigte wiederum keine große Veränderung gegenüber der aktiven Form (Abb. 18b).

Die Serotypen 4 und 8, welche an Proband AD-018 getestet wurden (s. Abb. 18c), wiesen in der inaktivierten Form eine höhere Spotzahl auf. Beim AdV-4 lag ein Unterschied in der Signalthöhe um 21,6 SFC vor, im Falle des AdV-8 bestand ein Unterschied von 37 SFC.

Als letzter Serotyp wurde das AdV-34 getestet (s. Abb. 18d). Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zu Gunsten des unbehandelten Virus. Während das replikationsfähige Virus in der Lage war, eine Signalthöhe von 47,6 SFC zu erzeugen, kam es beim inaktivierten Virus nach Abzug der NK zu keiner messbaren spezifischen T-Zellantwort.



**Abbildung 18: Vergleich von unbehandeltem und hitzeinaktiviertem Adenovirus im ELISpot.** Die Viren wurden in einem Heizblock über 30 Minuten bei 70°C erhitzt und anschließend für 10 Minuten sonifiziert (inaktiv). Diese wurden an einzelnen Probanden im ELISpot getestet und dem unbehandelten Virus (aktiv) bezüglich ihrer Signalhöhen gegenübergestellt. Bei den SFC handelt es sich um Mittelwerte abzüglich der Negativkontrolle, sodass Ergebnisse auch im negativen Bereich liegen können.

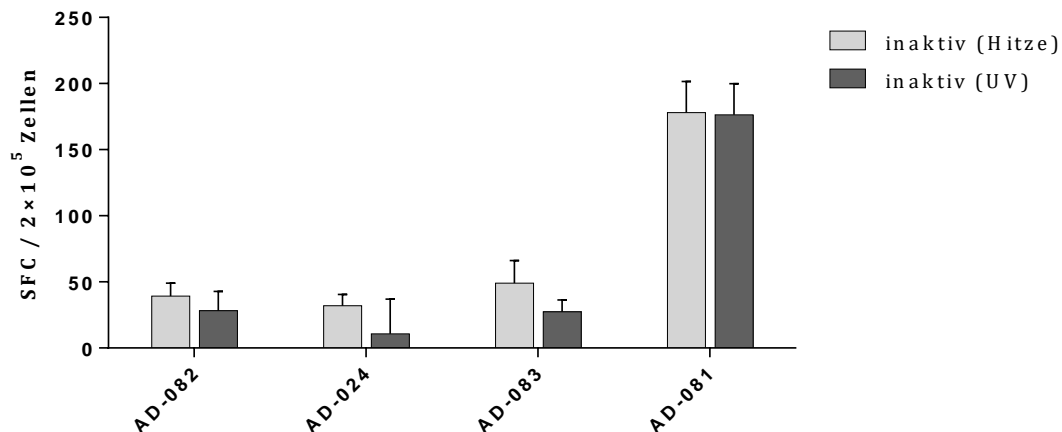
**a:** AdV-1,-2,-5 und -6 (AD-052) **b:** AdV-3,-7 und -12 (AD-026) **c:** AdV-4 und -8 (AD-018) **d:** AdV-34 (AD-006)

Obwohl die Ergebnisse nicht komplett einheitlich waren und eine Einbuße in der Signalhöhe durch eine Inaktivierung der Adenoviren mittels Hitzeeinwirkung bei AdV-3, -7, -12 und insbesondere -34 zu beobachten war, wurde aus Sicherheits- und Hygienegründen in den folgenden Versuchsansätzen ausschließlich mit inaktivierten Viren gearbeitet.

### 3.4.2.1.6.2. Inaktivierung mittels UV

Die Viren wurden wie in 2.2.4.2. beschrieben behandelt. Für die Inaktivierung der Adenoviren mittels UV wurde exemplarisch das AdV-5 an 4 Probanden im ELISpot getestet und mit der hitzeinaktivierten Form verglichen. Das AdV-5 wurde verwendet,

da dieser Serotyp einen der häufigsten und für die Forschung relevantesten darstellt [98, 99]. Die Signalthöhe war in allen Fällen niedriger, die höchste Differenz wiesen AD-024 und AD-083 mit ca. 22 SFC im Mittelwert auf. Bei AD-081 war der Unterschied mit weniger als 2 SFC am geringsten.



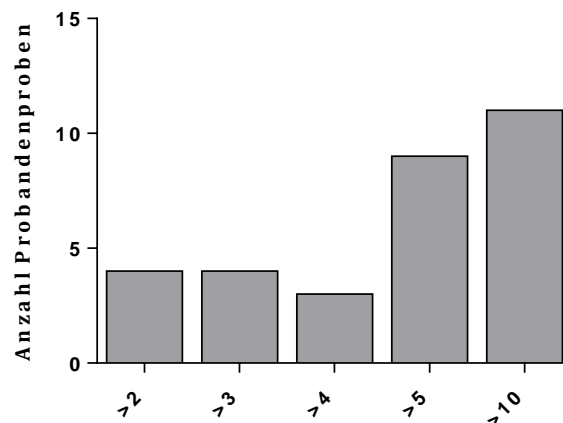
**Abbildung 19: Vergleich von hitze- und UV-inaktiviertem Adenovirus im ELISpot.** Das AdV-5 wurde exemplarisch getestet. Die Inaktivierungen erfolgten mit Hilfe des Stratalinker 1800 bei  $2 \times 5000 \mu\text{J}$  (inaktiv (UV)) und im Heizblock bei  $70^\circ\text{C}$  (inaktiv (Hitze)). Anschließend wurde das Virus jeweils 10 Minuten sonifiziert. Beide Ansätze wurden an vier Probanden im ELISpot getestet und bezüglich ihrer Signalthöhen gegenübergestellt. Es handelt sich bei den SFC um Mittelwerte abzüglich der Negativkontrolle.

### 3.4.2.1.7. Auswertung HSV-1

#### 3.4.2.1.7.1. Gesamtauswertung HSV-1

In die Gesamtauswertung des HSV-1 flossen ebenfalls die Ergebnisse von 19 Probanden ein, welche zweimal im Abstand von 6 Wochen getestet wurden. Die Auswertung erfolgte nach den oben genannten Kriterien (s. 3.4.2.1.). Die Versuchszahl betrug somit auch hier  $N=38$ .

Elf Probandenproben wiesen eine Signalthöhe auf, welche mehr als das zehnfache der NK betrug. Neun Proben zeigten eine mindestens fünffach höhere Antwort, womit mehr als 50% der Studienpopulation im oberen Spotzahlbereich lag. Weniger Proben reagierten mit niedriger Signalthöhe auf das HSV-1. So wiesen nur drei eine vierfach höhere Antwort und jeweils vier eine zweifach und dreifach erhöhte SFC-Zahl auf.



**Abbildung 20: Anzahl an Probandenproben in Abhängigkeit von der jeweiligen Signalhöhe hinsichtlich HSV-1 im ELISpot.** Alle positiven Ergebnisse von 19 Probanden beider Versuchsdurchgänge im ELISpot wurden ausgewertet, es gilt: N=38. Die Signalhöhen wurden als Vielfaches der Negativkontrolle in fünf Stufen unterteilt und der Anzahl der Probandenproben gegenübergestellt.

Auch wenn das HSV-1 im Gesamtergebnis eine hohe Immunantwort auslösen konnte, war die Reproduzierbarkeit zu beiden Zeitpunkten nur bei 63,2% der Probanden gegeben. Diese Probanden zeigten alle eine eindeutig positive SFC-Antwort auf HSV-1. Bei sieben Probanden traten diskrepante Testergebnisse, also ein positives als auch ein negatives, auf.

übereinstimmende Ergebnisse (in %)	Positive Ergebnisse	Negative Ergebnisse	Diskrepante Ergebnisse
63,2	12	0	7

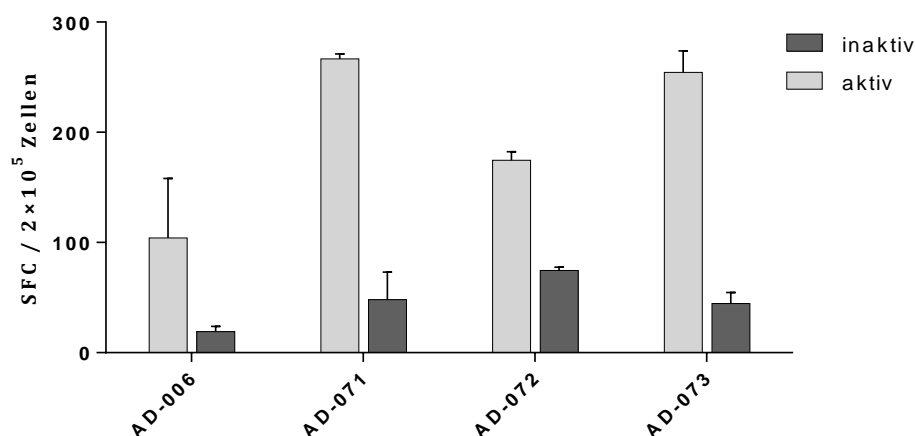
**Tabelle 15: Vergleich der Ergebnisse der Probanden zu beiden Zeitpunkten hinsichtlich HSV-1.** Die Ergebnisse beider Versuchsdurchgänge wurden auf ihre Übereinstimmung überprüft und in positive, negative sowie diskrepante Ergebnisse eingeteilt. Positive und negative Ergebnisse werden als übereinstimmende Ergebnisse bezeichnet und in Prozent angegeben. Es gilt: N=19.

### 3.4.2.1.7.2. Inaktivierung

#### 3.4.2.1.7.2.1. Inaktivierung mittels Hitze

Die Auswirkung der Hitzeinaktivierung des HSV-1 auf die Signalhöhe im ELISpot wurde in einem Vorversuch an vier Probanden getestet, welche zuvor mit einer hohen Spotzahl auf das unbehandelte Virus im ELISpot reagiert hatten. Die Hitzeinaktivierung wurde wie in 2.2.4.1. beschrieben durchgeführt.

Bei allen vier Probanden ließ sich ein deutlicher Unterschied zwischen den erzeugten Antworten durch die replikationsfähigen und den inaktivierten Viren feststellen (s. Abb. 21). So lag die Spotzahl des unbehandelten Virus bei AD-073 um 209,7 SCF höher als die der inaktivierten Form. Auch bei den Probanden AD-006 und -071 erzeugte die replikationsfähige Form eine mehr als fünfmal höhere Signalantwort als das inaktivierte Virus. Mit 100 Spots wies AD-072 die geringste Differenz zwischen den beiden Formen auf, jedoch lag auch hier die Zahl an SFC des unbehandelten Virus höher.



**Abbildung 21: Vergleich von unbehandeltem und hitzeinaktiviertem HSV-1 im ELISpot.**

Das Virus wurde im Heizblock über 30 Minuten bei 70°C erhitzt und anschließend für 10 Minuten sonifiziert (inaktiv). Anhand von vier Probanden wurde dieses im ELISpot getestet und dem unbehandelten Virus (aktiv) bezüglich ihrer Signalhöhen gegenübergestellt. Es handelt sich bei den SFC um Mittelwerte abzüglich der Negativkontrolle.

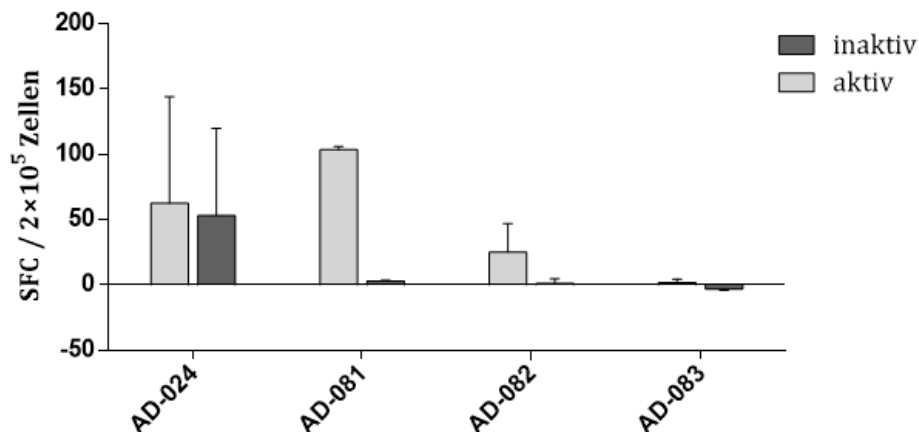
Aufgrund dieser deutlichen Unterschiede wurde auf eine Hitzeinaktivierung des HSV-1 in der ELISpot-Studie zu Gunsten der Signalhöhe verzichtet.

#### 3.4.2.1.7.2.2. Inaktivierung mittels UV

Die Inaktivierung des HSV-1 mittels UV-Licht wurde wie in 2.2.4.2. beschrieben durchgeführt und an vier Probanden im ELISpot getestet. Die Ergebnisse wurden denen des replikationsfähigen Virus vergleichend gegenübergestellt.

In allen vier Ansätzen war die Signalhöhe des durch das mit UV-Licht inaktivierte Virus niedriger, als die des replikationsfähigen Virus. Die Differenz war bei AD-024 und AD-083 mit 9,4 und 5,3 SFC gering, wobei beim zuletzt genannten Probanden die Signalhöhe bereits beim replikationsfähigen Virus äußerst niedrig war. Bei AD-081 war

die Differenz mit 100,7 und bei AD-082 mit 23,7 SFC in beträchtlichem Maße niedriger. Auffallend war zudem, dass sich bei diesen Probanden mit dem UV-inaktivierten im Gegensatz zum replikationskompetenten Virus keine spezifische SFC-Antwort induzieren ließ.



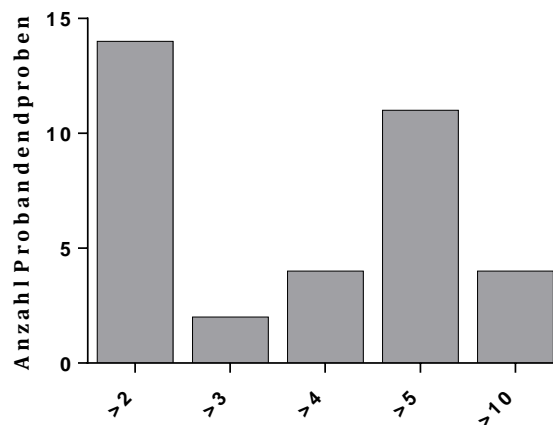
**Abbildung 22: Vergleich von unbehandeltem und UV-inaktiviertem HSV-1 im ELISpot.**

Das Virus wurde mit Hilfe des Stratalinker 1800 mit  $2 \times 5000 \mu\text{J}$  behandelt (inaktiv) und im Anschluss für 10 Minuten sonifiziert. Das behandelte Virus wurde anhand von 4 Probanden im ELISpot getestet und dem unbehandelten Virus (aktiv) bezüglich der Signalhöhen gegenübergestellt. Es handelt sich bei den SFC um Mittelwerte abzüglich der Negativkontrolle, sodass Ergebnisse auch im negativen Bereich liegen können.

### 3.4.2.1.8. Auswertung VZV

#### 3.4.2.1.8.1. Gesamtauswertung VZV

Für die Auswertung der Ergebnisse des VZV im ELISpot galten dieselben beschriebenen Kriterien (s. 3.4.2.1.) wie für Adenoviren und HSV-1. Auch das VZV führte zu spezifischen SFC-Antworten im INF- $\gamma$ -ELISpot bei einigen Probanden. Auffallend ist hier, dass die durchschnittlich detektierten SFC-Zahlen beim VZV deutlich niedriger lagen als bei Adenoviren und HSV-1. So reagierten mit 14 Proben die meisten mit einer zweifach höheren Spotzahl. Eine zehnfach höhere erreichten nur vier Probandenproben. In elf Proben konnte eine Signalhöhe festgestellt werden, welche mehr als das fünffache gegenüber der NK betrug. Nur zwei Resultate wiesen eine dreifach höhere Spotzahl auf und vier Proben eine vierfach höhere. Die Mehrheit der Probanden zeigte in dieser Studie somit Signalhöhen, welche im niedrigen und mittelhohen Bereich lagen.



**Abbildung 23: Anzahl an Probandenproben in Abhängigkeit von der jeweiligen Signalhöhe hinsichtlich VZV im ELISpot.** Alle positiven Ergebnisse von 19 Probanden beider Versuchsdurchgänge im ELISpot wurden ausgewertet, es gilt: N=38. Die Signalhöhen wurden in fünf Stufen unterteilt und der Anzahl der Probandenproben gegenübergestellt.

Trotz der oft niedrig positiven Ergebnisse im ELISpot war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im zeitlichen Verlauf, besonders im Vergleich zum HSV-1, hoch. So stimmen 84,3% der Resultate zu beiden Zeitpunkten überein, wovon alle 16 Ergebnisse positiv ausfielen. Lediglich drei Probanden wiesen in den beiden Versuchsdurchgängen diskrepante Ergebnisse auf. Kein Proband wurde für VZV-SFC negativ getestet.

übereinstimmende Ergebnisse (in %)	Positive Ergebnisse	Negative Ergebnisse	Diskrepante Ergebnisse
84,3	16	0	3

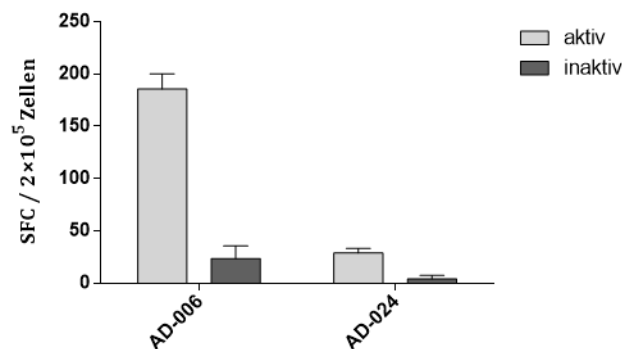
**Tabelle 16: Auflistung der Ergebnisse hinsichtlich des Vergleiches zu beiden Zeitpunkten hinsichtlich VZV.** Die Ergebnisse beider Versuchsdurchgänge wurden auf ihre Übereinstimmung überprüft und in positive, negative sowie diskrepante Ergebnisse eingeteilt. Positive und negative Ergebnisse werden als übereinstimmende Ergebnisse bezeichnet und in Prozent angegeben. Es gilt: N=19.

### 3.4.2.1.8.2. Inaktivierung

#### 3.4.2.1.8.2.1. Inaktivierung mittels Hitze

An zwei Probanden, welche in einem Vorversuch eindeutig positiv auf das VZV im ELISpot reagiert hatten, wurde ein zweiter Test durchgeführt, in dem die Immunreaktion auf ein mit Hitze inaktiviertes VZV geprüft wurde (s. Abb. 24).

In beiden Fällen lag die Signalhöhe des inaktivierten Virus unter der des replikationsfähigen. Bei AD-006 lag die Differenz bei 162 SFC, bei AD-024 betrug sie 24,7 SFC.



**Abbildung 24: Vergleich von unbehandeltem und hitzeinaktiviertem VZV im ELISpot.** Das Virus wurde im Heizblock über 30 Minuten bei 70°C behandelt und anschließend für 10 Minuten sonifiziert (inaktiv). Anhand von 2 Probanden wurde das hitzebehandelte Virus im ELISpot getestet und der unbehandelten Form (aktiv) bezüglich der Signalhöhen gegenübergestellt. Es handelt sich bei den SFC um Mittelwerte abzüglich der Negativkontrolle.

In den weiteren Versuchen wurde deshalb auf eine Hitzeinaktivierung verzichtet. Zum einen basierte dieser Schritt auf den vorliegenden Ergebnissen der Inaktivierung im ELISpot, zudem lag das VZV hier als Impfstamm vor, war also bereits attenuiert. So konnten sowohl die Sicherheit bei der Arbeit, als auch ein akzeptables und realistisches Ergebnis im ELISpot gewährleistet werden.

### 3.4.3. Vergleich Immunoassays

Wie in 1.5. erwähnt, war es von Interesse, im Anschluss an die ELISpot-Studie einen Vergleich mit einem Antikörper-ELISA als zweiten Immunoassay durchzuführen. Hierdurch sollte überprüft werden, ob und inwiefern die Ergebnisse des Zelltests und der Serologie voneinander abweichen oder sich ähneln. Zum Nachweis virusspezifischer Antikörper wurden validierte, kommerziell erhältliche ELISA-Tests verwendet. Die Probandenserum wurden in seriellen Verdünnungen in Mikrotiterplatten gegeben, welche mit einem virusspezifischen Antigen beschichtet waren. Gebundene virusspezifische Antikörper im Probandenserum wurden nach Zugabe eines zweiten, enzymgekoppelten Detektionsantikörpers und Substratzugabe durch photometrisch



messbaren Farbumschlag detektiert. Hierdurch sollte ein Vergleich der virusspezifischen T- und B-Zellantwort ermöglicht werden.

### 3.4.3.1. Vergleich ELISpot - ELISA – Adenoviren

Im Falle der Adenoviren wurden drei verschiedene ELISA-Verfahren durchgeführt und mit den Ergebnissen des ELISpots verglichen (s.Tabelle 17).

	Positiv		Negativ		Diskrepant	
	N	%	N	%	N	%
ELISpot-gesamt	148	77,9	14	7,4	28	14,7
ELISpot- Probanden	19	100	0	0	0	0
ELISA- Euroimmun	16	84,3	2	10,5	1	5,2
ELISA- Serion Erw.	1	5,2	17	89,6	1	5,2
ELISA- Serion Kind	3	15,8	15	79	1	5,2

**Tabelle 17: Vergleich der Ergebnisse für Adenoviren im ELISpot und im ELISA.** Für den Vergleich wurden dem ELISpot drei validierte, kommerziell erhältliche ELISA-Tests gegenübergestellt. Der ELISA-Euroimmun sowie der Serion ELISA mit den Grenzwerten für Erwachsene und für Kinder. Für die Durchführung der ELISA-Tests wurde Probandenplasma verwendet. Unterteilt werden die Ergebnisse in positiv, negativ und diskrepant. In Zeile 1 werden die Immunantworten von 10 Serotypen und 19 Probanden einberechnet, sodass gilt: N=190. Zeile 2 berücksichtigt lediglich Probanden, welche mindestens eine positive Immunantwort im ELISpot aufwiesen, es gilt: N= 19. Für die ELISA-Tests gilt ebenfalls N=19.

Mit dem ELISA von Euroimmun wurden mit 84,3% am meisten Probanden positiv gewertet. Dem gegenüber standen im ELISpot 77,9% positive Immunantworten bei

Verwendung von 10 Adenoviren bei 19 Probanden (Abb.17, Zeile 1). Diese Immunantworten sind über alle Probanden unterschiedlich verteilt, wobei jeder Proband mindestens eine positive Immunreaktion im ELISpot hatte (Abb.17, Zeile 2). Deutlich weniger positive Ergebnisse wurden im ELISA von Virion/Serion erhalten. Hier waren es 15,8% bei Anwendung der Messgrenzen für Kinder und nur 5,2% im Test mit den Grenzwerten für Erwachsene. Dementsprechend lagen hier die negativen Ergebnisse höher. Während nur 10,5% im Euroimmun und 7,4% der Probanden im ELISpot ein negatives Ergebnis erhielten, waren es in den Tests von Virion/Serion 89,6% bei Erwachsenen und 79% nach den Grenzwerten für Kinder. Bei den diskrepanten Ergebnissen waren die drei ELISA-Testverfahren bei jeweils einem Probanden vergleichbar, während die Zahl im ELISpot bei insgesamt 28 diskrepanten Ergebnissen lag.

#### 3.4.3.2. Vergleich ELISpot - ELISA – HSV-1

In beiden Tests ließ sich bezüglich der positiv getesteten Probanden eine gute Übereinstimmung feststellen (s. Tabelle 18).

	Positiv		Negativ		Diskrepant	
	N	%	N	%	N	%
ELISpot	12	63,2	0	0	7	36,8
ELISA	11	58	7	36,8	1	5,2

**Tabelle 18: Vergleich der Ergebnisse für HSV-1 im ELISpot und im ELISA.** Für den Vergleich wurde dem ELISpot ein validierter, kommerziell erhältlicher Test von Virion/Serion gegenübergestellt. Für die Durchführung des ELISA wurde Probandenplasma verwendet. Die Ergebnisse werden in positiv, negativ und diskrepant unterteilt. Für beide Testformen gilt: N=19.

So waren es im ELISpot zwölf und im ELISA elf Probanden, also 63,2%, bzw. 58% der gesamten Studienpopulation. Im Gegensatz hierzu zeigte sich im ELISA mit 36,8% ein hoher Prozentsatz an negativen Ergebnissen, während es im ELISpot kein einziges negatives Resultat gab. Wiederum zeigten sieben Probanden im ELISpot ein diskrepantes Ergebnis, im ELISA erhielt nur ein Proband ein solches.

### 3.4.3.3. Vergleich ELISpot – ELISA – VZV

Im Falle des VZV entsprachen sich die Ergebnisse im ELISpot und im ELISA im Vergleich aller drei Virusspezies am besten (s. Tabelle 19).

	Positiv		Negativ		Diskrepant	
	N	%	N	%	N	%
ELISpot	16	84,3	0	0	3	15,7
ELISA	19	100	0	0	0	0

**Tabelle 19: Vergleich der Ergebnisse für VZV im ELISpot und im ELISA.** Für den Vergleich wurde dem ELISpot ein validierter, kommerziell erhältlicher Test von Virion/Serion gegenübergestellt. Für die Durchführung des ELISA wurde Probandenplasma verwendet. Die Ergebnisse werden in positiv, negativ und diskrepant unterteilt. Für beide Testformen gilt: N=19.

16 Probanden, also 84,3% der Studienpopulation wurden im ELISpot positiv getestet. Im ELISA waren es 100%. In keinem der Tests wurde ein Proband negativ getestet. Mit drei Probanden waren 15,7% der erhaltenen Ergebnisse im ELISpot diskrepant.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Anzucht der Viren in FKS-freiem Medium**

Wie in den Ergebnissen dargestellt, ist es gelungen, sowohl die Adenoviren als auch das HSV-1 in FKS-freiem Medium anzuzüchten. Leider war dies im Falle des VZV aufgrund der ohnehin schon schwierigen Anzuchtbedingungen nicht möglich, sodass man das FKS-haltige Medium zu Gunsten eines ausreichend hohen Virustiters in Kauf nahm. Durch eine Verdünnung mit AIM-V im ELISpot wurde zusätzlich das Risiko vermindert, das Ergebnis durch das FKS stark zu beeinflussen. Aufgrund der im Vergleich zu den anderen Viren niedrigen SFCs im ELISpot ist zudem zu bezweifeln, dass es hierdurch zu einer unspezifischen Stimulation von T-Zellen im Test gekommen ist.

Da das HSV-1 aus dem Überstand gewonnen wurde, lag dieses in AIM-V vor und erfüllte somit die optimalen Bedingungen für den ELISpot. Die Adenoviren wurden, wie in 2.2.2.5. beschrieben, nach dem Aufschluss der Zellen in DMEM ohne den Zusatz von FKS aufgenommen. Dies stellt einen Kompromiss dar, welcher das bewährte Protokoll zur Infektion der Zellen mit Adenovirus berücksichtigt und gleichzeitig den Einsatz von FKS vermeidet. Auch hier wurden von den in DMEM vorliegenden Viren für den ELISpot nur wenige Mikroliter mit AIM-V auf 100 µl aufgefüllt, sodass auch die Adenoviren nahezu FKS-frei im ELISpot eingesetzt werden konnten.

### **4.2. Anzucht des VZV**

Obwohl MRC-5-Zellen bereits als Wirt für die Anzucht von VZV und auch für den Impfstamm beschrieben wurden [100, 101], zeigte die Anzucht mit Hilfe dieser Zellen keine Erfolge und ein zytopathischer Effekt war auch nach mehreren Passagen nicht erkennbar. Aus diesem Grund wurde ein Infektionsversuch mit primären humanen fetalen Fibroblasten durchgeführt, die ebenfalls als infizierbar durch das VZV gelten [102]. Auch wenn die Anzucht immer noch mühsam war und kein eindeutiger zytopathischer Effekt gesehen wurde, konnte in der PCR ein positiver Titer nachgewiesen werden, welcher im Überstand höher war, als in den aufgeschlossenen Zellen. Jedoch musste festgestellt werden, dass nach einigen Passagen, in denen der PCR-Titer stetig gestiegen war, kein Virusnachweis mehr erbracht werden konnte, sodass die weitere Anzucht zur Erhöhung des Titers abgebrochen werden musste.

Dies mag an der Empfindlichkeit des Virus, insbesondere gegenüber dem „freeze and thaw“ Verfahren liegen [100], die eine Erzeugung von zellfreiem Virus deutlich erschwert.

Mit dem im Überstand gewonnenen Virus ist es gelungen, einen Titer zu erlangen, mit welchem man im ELISpot in der Lage war, VZV-spezifische T-Zellen zu detektieren.

#### **4.3. Bestimmung des Virustiters**

Verschiedene Methoden wurden durchgeführt, um den Titer aller Viren so genau wie möglich zu bestimmen. Ein Titer, welcher die Menge des replikationsfähigen Virus widerspiegelt, wäre wünschenswert. Allerdings gelang die Durchführung dieser Tests nur in mäßigem Umfang. Im FFA konnte nur für einen Teil der Adenoviren ein auswertbares Ergebnis erzielt werden. Für die restlichen Serotypen sowie für das HSV-1 wurde versucht, den Titer mit Hilfe eines Plaque Assays zu bestimmen. Doch auch hier waren die Ergebnisse nur begrenzt zu beurteilen, obwohl dieses Verfahren besonders im Falle des HSV-1 etabliert ist [103]. Auf einen Versuch der Titerbestimmung mittels Plaque Assay für das VZV wurde vollständig verzichtet. Das Verfahren ist zwar auch für dieses Virus bereits mehrfach beschrieben [101, 104], allerdings führten zum einen die Schwierigkeiten, die es bereits beim HSV-1 mit diesem Assay gab, zu dieser Entscheidung. Zusätzlich war das VZV von Beginn an schwer anzuzüchten, wodurch letztendlich nur wenig Virussuspension erhalten wurde. Zudem dauerte die Infektion der Zellen oft mehr als zehn Tage und ohne Erkennbarkeit eines deutlichen zytopathischen Effekts. Es schien somit unwahrscheinlich, dass der Plaque Assay aussagekräftige Ergebnisse für das VZV liefern würde. Aus diesem Grund wurde für die Bestimmung der Virustiter das Ergebnis der PCR genutzt. Dies hat den Vorteil, dass für alle Viren eine einheitliche Quantifizierungsmethode verwendet wurde und die Bestimmung unter standardisierten diagnostisch akkreditierten Bedingungen stattfand. Die Ergebnisse des FFA lagen in den meisten Fällen etwa zwei log-Stufen unterhalb des PCR-Titers und wurden für die Wahl des eingesetzten Titers im ELISpot als Orientierungshilfe verwendet.

#### **4.4. Adenoviren**

##### **4.4.1. Ergebnis des ELISpot für Adenoviren**

Durch die ELISpot-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Serotypen des Adenovirus zu verschieden starken Immunreaktionen führen. Abhängig vom Serotyp gibt es also unterschiedlich viele T-Zellen, welche das Virus als Antigen erkennen und darauf mit einer Sekretion von Interferon- $\gamma$  reagieren. Die genauere Betrachtung zeigt jedoch auch, dass Serotypen derselben Spezies bei ähnlich vielen Probandenproben ähnliche Antworten hervorriefen. So konnte bei AdV-1 und AdV-2 bei jeweils 18 Proben eine Signalthöhe nachgewiesen werden, welche um mehr als das Zehnfache über der NK lag. Für das AdV-5 war dies bei 17 Probandenproben der Fall und bei AdV-6 zeigten sich 19 Proben mit dieser Signalthöhe. Alle vier Serotypen gehören der Spezies C an, die sehr häufig, besonders im Kleinkindalter, isoliert wird [32]. Auch die anderen SFC-Antworten waren bei diesen Serotypen vergleichbar hoch. Bei keinem dieser Serotypen wurde ein negatives Ergebnis erhalten und auch bei den einzelnen Probanden wiesen sie eine ähnlich hohe Zahl an SFC auf. Ähnlich verhielt es sich mit den Serotypen AdV-3 und AdV-7, welche der Subspezies B1 angehören und ebenfalls häufig nachgewiesen werden.

Anders zeigte es sich mit den Viren der Spezies A, D und B2, welche seltener nachzuweisen sind als die zuvor genannten. Die Signalthöhe wies bei diesen Serotypen eine stärkere Verteilung auf und bei einer größeren Zahl an Proben wurden nur 2 bis 3-mal mehr SFC nachgewiesen als in der jeweiligen NK. Besonders bei AdV-12 und AdV-34 wurden auch einige negative Ergebnisse erzielt. Auffällig ist auch, dass gerade die selteneren Serotypen AdV-4, -8 und -34 deutlich weniger übereinstimmende Ergebnisse aufwiesen als die häufigeren. So wiesen die Serotypen der Spezies B1 und C im überwiegenden Teil 94,7% eindeutig positive Ergebnisse auf. Weitaus mehr diskrepante Ergebnisse lagen bei den Selteneren vor und besonders bei AdV-8 und -34 reagierten auch mehrere Probanden negativ.

Hier stellt sich die Frage, ob diese Ergebnisse auf dem epidemiologischen Vorkommen der Adenoviren beruhen oder ob hier auch die oft beschriebene Kreuzreaktivität adenovirusspezifischer T-Zellen, also CD4<sup>+</sup>- wie CD8<sup>+</sup>-Zellen, eine Rolle spielt [22, 25, 26, 105–111]. Hierfür würde sprechen, dass die Mehrheit der Probanden auch auf Serotypen mit einem positiven Ergebnis im ELISpot reagierten, welche nur eine niedrige Seroprävalenz in der Bevölkerung aufweisen. In verschiedenen Studien

konnte gezeigt werden, dass die Antigenbindungsstellen überwiegend gegen Epitope des Hexonproteins gerichtet sind, welche in der hochkonservierten Region liegt. [22–24, 97, 106, 110, 111]. Bezüglich der Anwendung des ELISpots zur Überprüfung des T-Zellstatus bei stammzelltransplantierten Patienten wäre dies von Vorteil, da eine Kreuzreaktivität die Verwendung vieler verschiedener Serotypen im Test überflüssig machen würde. Die ähnlich hohen Ergebnisse von Serotypen einer Subgruppe legen nahe, dass für jede Spezies ein Virus zur Feststellung der T-Zellantwort ausreichen würde. In früheren Studien wurde lediglich ein Serotyp im ELISpot verwendet und aufgrund des kreuzreaktiven Verhaltens adenoviruspezifischer T-Zellen für ausreichend befunden. [107, 109]. Mit diesem Verfahren bestünde ein hoch sensibler und spezifischer Assay, mit dem man die Anzahl adenoviruspezifischer T-Zellen im Blut von Patienten nach Stammzelltransplantation im Sinne einer Verlaufskontrolle überprüfen könnte. Im Falle des Unterschreitens einer kritischen Grenze hätte man zeitnah die Möglichkeit, präventiv zu agieren.

#### **4.4.2. Hexonprotein als Antigen im ELISpot**

Die Ergebnisse der zwei Hexonproteine im INF- $\gamma$ -ELISpot zeigen deutlich, dass sowohl das Hexonprotein als Gesamtantigen, als auch eine Peptidmischung aus mehreren Aminosäuresequenzen in der Lage sind, adenoviruspezifische T-Zellen zu stimulieren und somit im ELISpot zur Detektion dieser anwendbar sind. In einigen Studien wurde das Hexon im ELISpot zur Detektion adenoviruspezifischer T-Zellen bereits verwendet [24, 25, 97, 109, 112]. Die Tatsache, dass ein großer Teil der virusspezifischen T-Zellen Epitope des Hexonproteins erkennen [111, 112, 113], ist von großem Vorteil, da solch ein Protein zur Verwendung im Test ausreichen würde, um mit Hilfe des ELISpots eine zuverlässige Aussage über den Immunstatus des Patienten machen zu können. Zudem wurde bereits erwähnt, dass die T-Zellantwort zumeist gegen Epitope in hochkonservierten Regionen des Strukturproteins gerichtet ist. Diesen Vorteil kann man sich ebenfalls zu Nutze machen, indem man durch die Identifikation der hexonspezifischen T-Zellen vermutlich eine Immunabwehr gegen den überwiegenden Teil der Serotypen gewährleisten könnte. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl CD8<sup>+</sup>- als auch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen Rezeptoren mit Spezifität für das Hexonprotein exprimieren. Es wären somit beide Arme der T-Zellvermittelten Immunantwort abgedeckt. Es wird vermutet, dass besonders CD4<sup>+</sup>-

Zellen, darunter vor allem  $T_H1$ -Zellen, eine wichtige Bedeutung bei der effektiven Bekämpfung von Adenovirusinfektionen zukommt [24, 34, 107, 112, 114]. Man hätte somit ein gutes Werkzeug, welches die relevante Zellpopulation mit hoher Sensitivität und Spezifität detektiert und zudem vergleichsweise kosten- und zeiteffizient ist. Das synthetisch hergestellte Protein kann von diversen Firmen bezogen werden und muss nicht erst, wie die Adenoviren, mit hoher Arbeits- und Zeitintensivität sowie mit Hilfe von Zellkulturen angezüchtet werden.

In einem nächsten Schritt muss bewertet werden, ob und wenn ja welches der Hexonproteine im Vergleich ein besseres Ergebnis aufweist. Wie in 2.1.6. beschrieben, handelt es sich bei dem Hexon 2 um ein vollständiges, zusammenhängendes Protein, während das Hexon 5 aus 15-meren Peptidsequenzen besteht, die sich jeweils um 11 Aminosäuren überlappen und die die gesamte Länge des Hexonproteins umfassen. Serangeli et al. verglichen bereits das Hexon 2-Protein mit einem Pool aus diversen Peptidsequenzen im ELISpot und legten die Empfehlung nahe, das Hexon 2 als Gesamtantigen zu verwenden, da dies bessere Ergebnisse erzielte und mit höherer Wahrscheinlichkeit in der Lage ist, durch ein breites Spektrum an Epitopen eine T-Zellantwort zu induzieren. Dies mag zutreffen, zumal eine  $CD8+$ -vermittelte T-Zellantwort durch die Verwendung kurzer Peptidsequenzen unwahrscheinlich ist und somit ein wichtiger Teil der Immunantwort außer Acht gelassen würde. Jedoch wurde 2008 von Leen et al. ein Epitop detektiert, welches im ELISpot eine Stimulation von  $CD8+$ -T-Zellen bewirkte und auch der Hersteller verspricht eine Stimulation dieser Zellpopulation [112]. Bei der Betrachtung der erhaltenen Ergebnisse, erzielte das Hexon 5 sogar höhere Resultate als das Hexon 2 als Gesamtprotein.

Der Vergleich der in dieser Studie gewonnenen Daten legt nahe, dass das Hexon 5 in der Lage war, eine stärkere T-Zellantwort zu stimulieren als das Hexon 2. Auch bei der Betrachtung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu beiden Zeitpunkten stellte sich das Hexon 5 als das überlegene heraus. So lag der Prozentsatz der übereinstimmenden Ergebnisse bei Hexon 2 bei lediglich 68,4% (N=19), wohingegen sie im Falle des Hexon 5 bei 93,3% lagen (N=15). Zudem wurde das Hexon 5 von mehr Probanden zu beiden Zeitpunkten erkannt als das Hexon 2. Darüber, ob durch das Peptidgemisch doch beide T-Zellpopulationen stimuliert werden oder das Peptid durch die Aufteilung in kurze Sequenzen sogar einen Vorteil gegenüber dem Hexon 2 besitzt, lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren.



Ein weiterer Aspekt, den es zu diskutieren gilt, ist der Vergleich der Signalthöhe und damit die Höhe der detektierten hexonspezifischen T-Zellen der Hexonproteine mit denen der Viren. Hier wurde deutlich, dass die Adenoviren als Gesamtantigen weitaus potenter waren als die einzelnen Strukturproteine. So lagen die Mediane von Hexon 2 und 5 mit 14, 8 und 42 SCF/ $2 \times 10^5$  Zellen niedriger, als die Mediane der entsprechenden Serotypen (AdV-2: 86,9 SCF; AdV-5: 85,6 SCF). Offensichtlich deckt das Hexonprotein allein nicht alle T-Zellepitope ab. Haverman et al. beschrieben auch andere T-Zellepitope, unter anderem diverse „Early-Proteine“, eine DNA-Polymerase als auch das Fiberprotein [113]. In Mausmodellen wurden ebenfalls „Early-Proteine“ als wichtige immunogene Strukturen genannt [115, 116]. Auch wenn diese gegenüber dem Hexon in deren Bedeutung als immunogene Struktur untergeordnet scheinen, so dürfen sie doch nicht außer Acht gelassen werden.

#### **4.4.3. Bestimmung der optimalen Konzentration des AdV-12**

Wie bereits erwähnt, stellt das AIM-V das Standardmedium im ELISpot dar. Anhand des Konzentrationsversuchs des AdV-12 wurde deutlich, welchen Einfluss die Wahl des Mediums auf das Ergebnis im Assay hat. Um einen möglichst einheitlichen Titer zu verwenden, wurden zu Beginn je 67  $\mu$ l/Well ( $1 \times 10^8$  copies/ml) eingesetzt. Dies war kritisch, da es einen zu hohen Verbrauch der nur begrenzt vorhandenen Virussuspension nach sich zog. Zudem musste festgestellt werden, dass die Signalthöhe im ELISpot im Vergleich zu den anderen Serotypen deutlich niedriger oder auch oft negativ ausfiel. Mit großer Wahrscheinlichkeit war dies darauf zurückzuführen, dass das DMEM, in welchem das Virus vorlag, nicht genügend Nährstoffe für die im ELISpot eingesetzten Zellen bereitstellte und diese folglich untergingen, bevor es zu einer Stimulation mit anschließender Interferonsekretion durch sie kommen konnte. Die Ergebnisse der Konzentrationsreihe lassen erkennen, dass trotz verminderten Titers höhere SFC-Frequenzen nachweisbar waren. Der Einsatz von anderen Medien ist also begrenzt und ein geringerer Titer sollte zu Gunsten eines größeren Volumens an AIM-V in Kauf genommen werden.

#### **4.4.4. Inaktivierung mit Hitze und UV im ELISpot**

Die Inaktivierung von Adenoviren mittels Hitze wurde bereits beschrieben [122] und auch dessen Einsatz im ELISpot wurde vereinzelt gezeigt [123]. Da im FFA ein Beweis für die erfolgreiche Inaktivierung erbracht werden konnte und auch die Ergebnisse im ELISpot im überwiegenden Teil vergleichbar zur Signalthöhe der replikationsfähigen Form waren, wurde für das Inaktivierungsprotokoll für die Studie beibehalten. Die Virusinaktivierung mit UV ist bereits in der Literatur zu finden und wurde auch im ELISpot angewendet, allerdings mit nur ungenauen Angaben [110]. Die Überprüfung der erfolgreichen Inaktivierung mit Hilfe des FFA zeigten zu Beginn jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Erst in einem späteren Ansatz, unter Benutzung anderer Geräte konnte ein erfolgreiches Ergebnis erzielt werden. Erste Testungen im ELISpot zeigten vergleichbare, jedoch etwas niedrigere Resultate mit dem hitzeinaktivierten Virus. Um ein sicheres Urteil über die Eignung für den ELISpot fällen zu können, ist es jedoch notwendig, die Überprüfung bei allen Serotypen durchzuführen, da in den vorliegenden Untersuchungen, wie auch in der Literatur, nur das AdV-5 überprüft wurde.

Unabhängig von der Art der Inaktivierung, ist die Überführung des Virus in eine nicht-infektiöse Form Voraussetzung für den Einsatz in einem L1-Labor. Die Adenoviren eignen sich in der Form, in welcher sie in dieser Studie eingesetzt wurden, gut für die Verwendung im L1-Labor der Routinediagnostik.

#### **4.4.5. Vergleich von ELISpot und ELISA**

Die drei Ansätze, welche in dieser Studie durchgeführt wurden, zeigen, dass das Ergebnis stark von den Grenzwerten des jeweiligen Tests abhängt. Da beinahe jeder Mensch im Laufe des Lebens mit Adenoviren in Kontakt kommt, liegt die Seroprävalenz bei über 90% in der erwachsenen Bevölkerung [117]. Der ELISA von Euroimmun besitzt einen sehr weiten Referenzbereich, wodurch hier der überwiegende Teil der Probanden positiv getestet wurde. Im Vergleich hierzu ist der Referenzbereich des ELISAs von Serion für Erwachsene deutlich enger, mit dem Ziel, lediglich frische Infektionen zu identifizieren. Dementsprechend wurde durch diesen Test ein deutlich geringerer Teil der Probanden als seropositiv eingestuft. Auch durch Anwendung des Referenzbereichs für Kinder änderten sich die Ergebnisse nicht

maßgeblich und die Mehrzahl der Probanden erhielt ein negatives Ergebnis. Die Frage, wie aussagekräftig die Bewertung des Serostatus ist und welche Konsequenz daraus resultiert, ist insbesondere für Risikogruppen wie Stammzelltransplantierte Patienten wichtig. Hier bestehen unterschiedliche Daten zum Einfluss des Serostatus von Spender und Empfänger auf Infektionen mit Adenoviren [118, 119]. Die Datenlage ist wiederum eindeutig, wenn es um die Rolle des T-Zellstatus zur Bekämpfung von Adenovirusinfektionen geht [92, 120, 121]. Da der ELISpot zudem eine hohe Sensitivität und Spezifität besitzt, besäße er hier gegenüber dem ELISA-Verfahren einen deutlichen Vorteil.

#### **4.5. HSV-1**

##### **4.5.1. HSV-1 im ELISpot**

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass PBMC im ELISpot durch das HSV-1 stimuliert werden und mit einer Sekretion von INF- $\gamma$  reagieren. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass der Großteil der positiv getesteten Probandenproben eine 5-fach oder 10-fache Signalhöhe gegenüber der NK aufwiesen, das Virus also auch in der Lage war, eine starke zelluläre Immunantwort auszulösen. Trotz dieser Ergebnisse darf nicht außer Acht gelassen werden, dass nur 63,2% ein eindeutig positives Ergebnis erzielten und 7 von 19 Probanden ein diskrepantes Ergebnis aufwiesen. Die Tatsache, dass kein einziger Proband eindeutig negativ getestet wurde, lässt jedoch vermuten, dass auch die Probanden mit diskrepanten Ergebnissen eine gewisse Immunität gegenüber dem HSV-1 besitzen. Ob die Diskrepanz dieser Ergebnisse z.B. auf der schwankenden Immunitätslage der Probanden beruht oder auf einem anderen Grund, konnte durch die bisherigen Untersuchungen noch nicht geklärt werden. Obwohl nicht alle Resultate eindeutig ausfielen, besteht mit diesem Nachweisverfahren ein nützliches Werkzeug zur Überprüfung des T-Zellstatus im Blut für dieses Virus. In einem nächsten Schritt wäre zu überprüfen, ob der ELISpot auch mit BAL-Proben durchführbar ist. Da eine Reaktivierung von HSV-1 als mögliche Ursache für Pneumonien bei intubierten Patienten vermutet wird [93], wäre es von Interesse, zu sehen, inwiefern die Zahl virusspezifischer T-Zellen in der Lunge mit der Schwere der Erkrankung und dem klinischen Verlauf assoziiert ist. Mehrfach wurde bereits beschrieben, dass bei der Bekämpfung einer Infektion mit reaktiviertem HSV-1 eine INF- $\gamma$ -abhängige T-Zellantwort, darunter besonders die der CD4+-T-Zellen,

eine entscheidende Rolle spielt [132–134]. Ein ähnlicher Ansatz wurde bei Tuberkulosepatienten durchgeführt, für welches das ELISpot-Verfahren bereits in der Diagnostik etabliert ist. In diesen Studien konnte erfolgreich die Durchführbarkeit eines ELISpot in Bronchiallavage (BAL)-Proben nachgewiesen werden [135]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse des BAL-ELISpot eine höhere Sensitivität aufweisen als die der ELISpot-Tests mit PBMC. Eine vergleichende Studie für Zellen aus der BAL und PMBC für das HSV-1 wird derzeit in der Arbeitsgruppe geplant.

#### **4.5.2. Inaktivierung mit Hitze und UV im ELISpot**

Beim HSV-1 wurde zunächst die Hitzeinaktivierung getestet [124, 125]. Während das eine Protokoll 10 Minuten bei 56°C vorsah, beschrieben Chiara et al. eine Inaktivierung bei 70°C über 30 Minuten. In dieser Studie wurde nach zweitem Protokoll verfahren, jedoch ohne die erwünschten Ergebnisse im ELISpot zu erzielen. Die inaktivierte Form wies eine deutlich niedrigere Signalhöhe auf und schien somit nicht mehr ausreichend als Antigen zu fungieren. Auch die zweite Alternative, die UV- Inaktivierung brachte nicht die erhofften Resultate, obwohl sie sich im Infektionsversuch als effektive Methode herausstellte. Dies ist enttäuschend, zumal bereits beschrieben wurde, dass HSV-1 auch nach der Inaktivierung durch UV (5J, 10 min., max. Output) noch zu einer Aktivierung von PBMC führte [126]. Die im Versuch eingesetzte Dosis lag mit 2×5000 µJ deutlich darunter. Dennoch scheint die Stimulation von T-Zellen auch durch diese Form vermindert und ist in dieser Form nicht sinnvoll. Jedoch wäre es im weiteren Verlauf von Interesse, eine Inaktivierungsform für das HSV-1 zu finden, bei welcher die Signalhöhe im ELISpot nicht beeinträchtigt wird. Andernfalls wäre ein Arbeiten mit diesem Virus lediglich im L2-Labor möglich, was mit höherem Kosten- und Zeitaufwand verbunden wäre.

#### **4.5.3. Vergleich von ELISpot und ELISA**

Vergleicht man die Ergebnisse des ELISpot mit denen des ELISA, fällt auf, dass etwa die gleiche Zahl an Probanden positiv getestet wurde, der ELISA jedoch sieben Probanden als negativ wertete, während dies im ELISpot bei keinem Probanden der Fall war. Von diesen sieben Probanden waren zudem nur drei im ELISpot mit einem diskrepanten Ergebnis aufgefallen, vier hingegen wurden eindeutig positiv getestet.

Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, die anhand des HSV-2 gemacht wurde [136] und eine virusspezifische T-Zellantwort bei negativem Serostatus gesunder Individuen nach sexueller Exposition mit HSV-2 beschreibt. Ähnliche Entdeckungen wurden in einer anderen Studie auch bei HBV gemacht [137]. In dieser wurden Sexpartner HBV-positiver Patienten identifiziert, welche Hbc-negativ getestet wurden, jedoch positiv im Zytokin-Sekretions-Assay auffielen und somit über eine T-Zellimmunität verfügten. Dieses Phänomen scheint also kein herpesspezifisches zu sein. Die Frage, ob es sich hierbei um subklinisch verlaufende Infektionen mit nur geringgradiger, auf T-Zellen beschränkte erworbener Immunität handelt, bleibt in beiden Fällen ungeklärt. Die Ergebnisse der jetzigen Studie könnten zumindest ein Indiz dafür sein, dass die Verhältnisse im Falle des HSV-1 ähnlich sind. Beide Erkenntnisse wiederum könnten einen Hinweis auf die bedeutsame Rolle der zellulären Immunantwort zur Bekämpfung oder Immunisierung gegenüber den Herpes-Simplex-Viren geben, sodass hier noch Bedarf zur weiteren Erforschung besteht.

#### **4.6. VZV**

##### **4.6.1. VZV im ELISpot**

Die Ergebnisse des VZV im ELISpot weisen im Schnitt, verglichen zu den anderen Viren, eine deutlich niedrigere Signalthöhe auf. Ein großer Teil der Probandenproben wies hier lediglich eine Menge an SFC auf, welche nur um das Zweifache über der NK lag. Zugleich reagierte jedoch auch mit 16 Probanden die Mehrheit (84,3%) eindeutig positiv und nur drei Probanden zeigten bei den zwei Testzeitpunkten diskrepante Ergebnisse. Mit dem ELISpot besteht somit ein hilfreiches diagnostisches Werkzeug, das in verschiedenen Bereichen angewendet werden könnte. Die Überwachung der T-Zellimmunität bei Immunsupprimierten wurde bereits untersucht und hat gute Ergebnisse erzielt [131, 138]. Bei dieser Risikogruppe ist eine Überprüfung besonders wichtig, da das Risiko einer Reaktivierung des VZV mit abnehmender Zahl virusspezifischer T-Zellen deutlich zunimmt. Durch die Impfung kann dieses Risiko deutlich gesenkt werden. Der ELISpot ermöglicht damit die Kontrolle des Impf- oder Immunstatus im Sinne einer Verlaufskontrolle. In diesem Kontext kann der ELISpot auch die Überprüfung des Immunstatus älterer Probanden ermöglichen. Sadaoka et al. konnte 2008 mit Hilfe des ELISpots zeigen, dass mit steigendem Alter die T-

Zellimmunität gegenüber VZV abnimmt [94]. Dies hat zur Folge, dass ein höheres Risiko einer Reaktivierung auch bei älteren Menschen besteht, mit dem klinischen Bild eines Herpes Zoster. Auch hier kann der Einsatz des ELISpot für Diagnostik und Prävention dieser häufigen Erkrankung einen großen Nutzen bringen.

#### **4.6.2. Inaktivierung mit Hitze im ELISpot**

Bezüglich der Hitzeinaktivierung des VZV liegen unterschiedliche Informationen vor [127, 128]. Von den vorliegenden Protokollen wurde abgewichen und es wurde versucht, das Virus mit 70°C über 30 Minuten zu inaktivieren. Aufgrund der Resultate, die im Inaktivierungsversuch erhalten wurden, war der Einsatz von hitzeinaktiviertem VZV nicht erfolgsversprechend, da nach Inaktivierung kaum noch eine Stimulation von T-Zellen stattgefunden hat. Das Virus gilt grundsätzlich als sehr empfindlich [129] gegenüber verschiedenen Formen physikalischer Einflüsse. Es schien somit schwierig, das Virus zu inaktivieren, ohne dessen immunogene Strukturen zu zerstören. Da es sich bei dem eingesetzten Virus um einen attenuierten Impfstamm handelt, war es im Rahmen dieser Studie vertretbar, das Virus ohne Inaktivierung einzusetzen, was allerdings in der täglichen Routinediagnostik womöglich nicht praktikabel sein könnte. In bereits durchgeführten Studien zur Überprüfung der T-Zell-vermittelten Antwort auf VZV mittels ELISpot wurde das VZV mit Hilfe von UV-Licht erfolgreich inaktiviert [130, 131], sodass hier noch zukünftig eine weitere zu testende Alternative bestünde. Wie im Falle des HSV-1 ist eine adäquate Inaktivierung von großem Interesse, da sie die Voraussetzung für den Einsatz des VZV im L1-Labor bildet.

#### **4.6.3. Vergleich von ELISpot und ELISA**

Die Ergebnisse im ELISA decken sich mit den Angaben über die Seroprävalenz in der Literatur [139]. Zudem unterscheidet sie sich nur geringfügig von den Ergebnissen des ELISpot, bei welchem für nur 3 Probanden ein diskrepantes Ergebnis auftrat. Doch hat sich der ELISA in der Überprüfung von Personen, welche anfällig sind für das VZV, nicht bewährt [95] und gilt in der Routinediagnostik nicht als Goldstandard.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung von ELISpot-Testverfahren zum Nachweis einzelner Interferon- $\gamma$ -sezernierender T-Zellen mit Spezifität für Adenoviren, HSV-1 und VZV für eine erweiterte Immundiagnostik. Mittels geeigneter Zellkultursysteme konnten die als Testantigen erforderlichen Viren (10 Serotypen der Adenoviren, HSV-1 und VZV) in ausreichenden Mengen angezüchtet und mit verschiedenen Verfahren wie Focus Forming Assays (FFA), Plaquenachweisverfahren oder PCR quantifiziert werden.

In einem nächsten Schritt wurden die Viren inaktiviert. Anhand des AdV-1 konnte, stellvertretend für die restlichen Serotypen im FFA gezeigt werden, dass eine Inaktivierung mittels Hitze bei 70°C über 30 min. zu einer effektiven Inaktivierung des Virus führt. Die Ergebnisse der inaktivierten Viren unterschieden sich im ELISpot nicht maßgeblich von den unbehandelten, sodass alle Serotypen der Adenoviren nach diesem Schema für den Einsatz im ELISpot inaktiviert wurden. Inaktivierungsversuche mit UV-Licht an AdV-5 zeigten vergleichbare Ergebnisse, sodass diese Form der Inaktivierung auch zur Verfügung stünde. Das HSV-1 zeigte im ELISpot eine deutliche Einbuße der Signalthöhe durch die Inaktivierung mit Hitze, sodass es im Rahmen dieser Studie im replikationsfähigen Zustand eingesetzt wurde. Gleiches gilt für das VZV.

In der durchgeführten Studie wurden 19 Probanden zweimal im Abstand von 6 Wochen im ELISpot auf die verschiedenen Serotypen des Adenovirus, die rekombinanten Hexonproteine, das HSV-1 und das VZV getestet. Durch Entnahme von PBMC aus den erhaltenen Blutproben wurde somit die T-Zellantwort gemessen. Im Falle der Adenoviren konnte ein INF- $\gamma$ -ELISpot etabliert werden, der für die häufig vorkommenden Serotypen der Spezies B und C deutlich höhere Prozentzahlen spezifisch reaktiver T-Zellen zeigte, als die der weniger frequenten Serotypen wie AdV-12 oder -34.

Im Vergleich der Hexonproteine erzielte das Hexon 5 im Median eine stärkere Signalthöhe als das Hexon 2 und ist somit ebenfalls geeignet, um eine Adenovirus-spezifische T-Zellantwort zu detektieren.

Das HSV-1 löste bei einem großen Teil der Probanden sehr hohe Zahlen an SFC aus, jedoch ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit 7 diskrepanten Ergebnissen zwischen den beiden Blutentnahmezeitpunkten bei den 19 Probanden relativ gering.

Das VZV zeigte im ELISpot, verglichen mit den anderen Viren, insgesamt sehr niedrige Spotzahlen. Dennoch lagen bei 84,3% Prozent der Probanden an beiden Entnahmezeitpunkten übereinstimmend positive Ergebnisse vor, während bei 3 Studienteilnehmern diskrepante Resultate auftraten.

Der Vergleich der Ergebnisse im ELISpot mit der im ELISA gemessenen Serologie zeigte bei Adenoviren deutliche Unterschiede. Am geringsten fiel dieser im Falle des ELISA der Firma Euroimmun aus, welcher auch den weitesten Grenzbereich aufweist. Während 77,9 % der Ergebnisse im ELISpot als positiv gewertet wurden, waren es im Falle dieses ELISA-Assays 84,3 %. Am größten war der Unterschied beim Serion ELISA für Erwachsene. Hier wurden nur 5,2 % der Probanden als positiv gewertet, während nahezu 90% ein negatives Ergebnis erzielten. Im Serion ELISA für Kinder wurden 15,8 % positiv gewertet und knapp 80 % als negativ.

Im Falle des HSV-1 fiel der Unterschied zwischen Serologie und T-Zellantwort kleiner aus. Den 12 positiv getesteten Probanden im ELISpot standen 11 im ELISA gegenüber. Während 7 Ergebnisse im ELISpot nicht eindeutig waren, wurden im ELISA 7 Probanden als negativ gewertet, während nur eines als nicht auswertbar befunden wurde.

Im ELISpot des VZV wurden 84,3 % der Probanden als positiv und 15,7 % diskrepant gewertet, im ELISA erreichten hingegen 100 % der Probanden ein positives Ergebnis. Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der ELISpot bei gesunden Probanden eine zuverlässige Aussage über den spezifischen T-Zellstatus bezüglich Adenoviren, HSV-1 und VZV geben kann. Daher ist es im weiteren Verlauf von Interesse, diese Ergebnisse auf eine Patientenstudie auszuweiten. Geplant ist die Anwendung des Testverfahrens an BAL-Proben intubierter Patienten, bei welchen der Verdacht einer HSV-1 assoziierten Pneumonie besteht, um die T-Zellantwort zu ermitteln (s.1.5.). Hierüber soll untersucht werden, ob der T-Zellstatus als Surrogatmarker für die Reaktivierungswahrscheinlichkeit des Virus dienen kann. Ebenso soll der ELISpot bei Immunsupprimierten, insbesondere Stammzelltransplantierten in einer Studie verwendet werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, mit Hilfe des ELISpots das Zytokinprofil der virusspezifischen T-Zellen intensiver zu erforschen. So können über den Einsatz verschiedener Primärantikörper unterschiedliche, durch T-Zellen sezernierte Zytokine detektiert werden und somit genauere Aussagen über die virusspezifische T-Zellantwort getroffen werden.



## 6. Anhang

### 6.1. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: Übersicht über die bekannten Spezies der Adenoviren, deren zugehörigen Serotypen sowie dem jeweiligen Organotropismus.....	16
TABELLE 2: Nährmedien und Zusatzstoffe.....	38
TABELLE 3: Viren.....	40
TABELLE 4: Primärantikörper für den Focus Forming Assay .....	40
TABELLE 5: Sekundärantikörper für den Focus Forming Assay .....	41
TABELLE 6: Primärantikörper für den ELISpot-Assay .....	41
TABELLE 7: Sekundärantikörper für den ELISpot-Assay .....	41
TABELLE 8: Hexonproteine, werden im Weiteren als Hexon 2 und Hexon 5 bezeichnet .....	42
TABELLE 9: Übersicht über die ELISA-Testkits und Kontrollen .....	43
TABELLE 10: Pipettierschema für den ELISpot-Assay in 96-Well MB Multiscreen PVDF-Platten .....	53
TABELLE 11: Übersicht über die im ELISpot eingesetzten Virustiter in copies/ml.....	54
TABELLE 12: Auflistung aller angezüchteten Viren, deren PCR-Titer in „copies/ml“ und Sequenzierungsnachweis.....	62
TABELLE 13: Vergleich der Ergebnisse der Probanden zu beiden Zeitpunkten hinsichtlich aller getesteten Serotypen.....	70
TABELLE 14: Vergleich der Ergebnisse der Probanden zu beiden Zeitpunkten hinsichtlich Hexon 2 und Hexon 5 im ELISpot.....	76
TABELLE 15: Vergleich der Ergebnisse der Probanden zu beiden Zeitpunkten hinsichtlich HSV-1. ....	82
TABELLE 16: Auflistung der Ergebnisse hinsichtlich des Vergleiches zu beiden Zeitpunkten hinsichtlich VZV .....	85
TABELLE 17: Vergleich der Ergebnisse für Adenoviren im ELISpot und im ELISA. ....	87
TABELLE 18: Vergleich der Ergebnisse für HSV-1 im ELISpot und im ELISA. ....	88
TABELLE 19: Vergleich der Ergebnisse für VZV im ELISpot und im ELISA. ....	89

## 6.2. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: Schematische Darstellung des Aufbaus des Adenovirus. ....	18
ABBILDUNG 2: Schematische Darstellung des Herpes-Simplex Virus. ....	24
ABBILDUNG 3: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des ELISpot-Assays. ....	34
ABBILDUNG 4: Vergleich der eingesetzten Medien bei H1299. ....	59
ABBILDUNG 5: Vergleich der eingesetzten Medien bei MRC-5. ....	60
ABBILDUNG 6: Titerbestimmung mittels FFA. ....	64
ABBILDUNG 7: Inaktivierungsversuch der Adenoviren. ....	66
ABBILDUNG 8: Inaktivierungsversuch des HSV-1 mittels UV. ....	67
ABBILDUNG 9: a: Altersverteilung b: Geschlechterverteilung der 19 Probanden. ....	67
ABBILDUNG 10: Anzahl der Probandenproben in Abhängigkeit von der jeweiligen Signalthöhe hinsichtlich der verschiedenen Serotypen des Adenovirus im ELISpot. ....	69
ABBILDUNG 11: Konzentrationsreihe des AdV-12. ....	72
ABBILDUNG 12: Konzentrationsreihe des Hexon 2. ....	73
ABBILDUNG 13: Konzentrationsreihe des Hexon 5. ....	74
ABBILDUNG 14: Anzahl an Probandenproben in Abhängigkeit von der jeweiligen Signalthöhe im ELISpot hinsichtlich Hexon 2 und Hexon 5. ....	75
ABBILDUNG 15: Vergleich von Hexon 2 und Hexon 5. ....	77
ABBILDUNG 16: Vergleich von AdV-2 und Hexon 2 im ELISpot. ....	77
ABBILDUNG 17: Vergleich von AdV-5 und Hexon 5. ....	78
ABBILDUNG 18: Vergleich von unbehandeltem und hitzeinaktiviertem Adenovirus im ELISpot. .....	80
ABBILDUNG 19: Vergleich von hitze- und UV-inaktiviertem Adenovirus im ELISpot. ....	81
ABBILDUNG 20: Anzahl an Probandenproben in Abhängigkeit von der jeweiligen Signalthöhe hinsichtlich HSV-1 im ELISpot .....	82
ABBILDUNG 21: Vergleich von unbehandeltem und hitzeinaktiviertem HSV-1 im ELISpot. ....	83
ABBILDUNG 22: Vergleich von unbehandeltem und UV-inaktiviertem HSV-1 im ELISpot. ....	84
ABBILDUNG 23: Anzahl der Probandenproben in Abhängigkeit von der jeweiligen Signalthöhe hinsichtlich VZV im ELISpot. ....	85
ABBILDUNG 24: Vergleich von unbehandeltem und hitzeinaktiviertem VZV im ELISpot. ....	86

### 6.3. Abkürzungsverzeichnis

#### A

AdV ..... *Adenovirus*  
 APC..... *Antigenpräsentierende Zelle*

#### B

BAL ..... *Bronchiallavage*

#### C

CAR-Rezeptor ..... *Coxsackie- und Adenovirusrezeptor*  
 CD..... *cluster of differentiation*  
 CPE..... *zythopathischer Effekt*

#### D

dsDNA..... *Doppelstrang-DNA*

#### E

ELISA..... *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
 ELISpot ..... *Enzyme-Linked-Immunospot Assay*

#### F

FFA ..... *Focus Forming Assay*  
 FFU ..... *Focus Forming Units*  
 FKS ..... *Fetales Kälberserum*

#### H

HFF ..... *Human Foreskin Fibroblasts*  
 HLA ..... *Human Leukocyte Antigen*  
 HSV-1 ..... *Herpes-Simplex-Virus 1*

#### I

IL ..... *Interleukin*  
 INF- $\alpha$  ..... *Interferon-alpha*  
 INF- $\beta$  ..... *Interferon-beta*

INF- $\gamma$ ..... *Interferon-gamma*  
 INF $\gamma$ R1 ..... *Interferon-gamma-Rezeptor*  
 IONO ..... *Ionomycin*  
 ISRE ..... *interferon stimulated response element*

#### K

kDa ..... *Kilodalton*

#### M

MHC ..... *Major Histocompatibility Complex*

#### N

NK-Zellen..... *Natürliche Killerzellen*

#### O

OD ..... *optische Dichte*

#### P

p.i..... *post infectionem*  
 PBMC ..... *Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes*  
 PCR ..... *Polymerasekettenreaktion*  
 PMA..... *Phorbol-12-myristat-13-acetat*

#### R

RE ..... *Relative Einheit*  
 rpm ..... *rounds per minute*  
 RT ..... *Raumtemperatur*

#### S

SFC ..... *Spot Forming Cell*  
 Strep-AP ..... *Streptavidin-Alkalische Phosphatase*

#### T

T<sub>cm</sub> ..... *T-Gedächtniszellen*

---

TCR.....	<i>T-Zellrezeptor</i>
T <sub>em</sub> .....	<i>Effektor-T-Gedächtniszellen</i>
TGF- $\beta$ .....	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
T <sub>H</sub> 1-Zelle.....	<i>Typ 1 T-Helferzelle</i>
T <sub>H</sub> 2-Zelle.....	<i>Typ 2 T-Helferzelle</i>
TNF- $\alpha$ .....	<i>Tumornekrosefaktor <math>\alpha</math></i>
TP .....	<i>terminales Protein</i>
T <sub>reg</sub> .....	<i>regulatorische T-Zelle</i>
<b>V</b>	
VZV .....	<i>Varizella-Zoster-Virus</i>

## 7. Literatur

- [1] MacPherson, G.; Austyn, J.: Exploring Immunology. Concepts and Evidence, 1. Aufl. s.l. 2013.
- [2] Vollmar, A.; Zündorf, I.; Dinger mann, T.: Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe ; mit 216 Tabellen, 2., völlig neu bearb. und erw. Aufl. Stuttgart 2013.
- [3] Modrow, S.: Molekulare Virologie, 3. Auflage. Heidelberg 2010.
- [4] Murphy, K.: Janeway's immunobiology 2014.
- [5] Fountoulakis, M.; Juranville, J. F.; Maris, A.; Ozmen, L.; Garotta, G.: One interferon gamma receptor binds one interferon gamma dimer. In: The Journal of biological chemistry 265 (1990) 32, S. 19758–67.
- [6] Ealick, S.; Cook, W.; Vijay-Kumar, S.; Carson, M.; Nagabhushan, T.; Trotta, P.; Bugg, C.: Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. In: Science 252 (1991) 5006, S. 698–702.
- [7] Boehm, U.; Klamp, T.; Groot, M.; Howard, J. C.: Cellular responses to interferon-gamma. In: Annual review of immunology 15 (1997), S. 749–95.
- [8] Bigley, N. J.: Complexity of Interferon-gamma Interactions with HSV-1. In: Frontiers in immunology 5 (2014), S. 15.
- [9] Cathcart, H. M.; Zheng, M.; Covar, J. J.; Liu, Y.; Podolsky, R.; Atherton, S. S.: Interferon-gamma, macrophages, and virus spread after HSV-1 injection. In: Investigative ophthalmology & visual science 52 (2011) 7, S. 3984–93.
- [10] Darnell, J.; Kerr, I.; Stark, G.: Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. In: Science 264 (1994) 5164, S. 1415–21.
- [11] Lalvani, A.; Brookes, R.; Hambleton, S.; Britton, W. J.; Hill, A. V.; McMichael, A. J.: Rapid effector function in CD8+ memory T cells. In: The Journal of experimental medicine 186 (1997) 6, S. 859–65.
- [12] Joffre, O. P.; Segura, E.; Savina, A.; Amigorena, S.: Cross-presentation by dendritic cells. In: Nature reviews. Immunology 12 (2012) 8, S. 557–69.
- [13] Boyman, O.; Sprent, J.: The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. In: Nature reviews. Immunology 12 (2012) 3, S. 180–90.

- [14] Sallusto, F.; Geginat, J.; Lanzavecchia, A.: Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. In: *Annual review of immunology* 22 (2004), S. 745–63.
- [15] Rowe, W. P.; Huebner, R. J.; Gilmore, L. K.; Parrott, R. H.; Ward, T. G.: Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. In: *Experimental Biology and Medicine* 84 (1953) 3, S. 570–73.
- [16] Davison, A. J.; Benko, M.; Harrach, B.: Genetic content and evolution of adenoviruses. In: *The Journal of general virology* 84 (2003) Pt 11, S. 2895–908.
- [17] Matthes-Martin, S.; Feuchtinger, T.; Shaw, P. J.; Engelhard, D.; Hirsch, H. H.; Cordonnier, C.; Ljungman, P.: European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). In: *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* 14 (2012) 6, S. 555–63.
- [18] Jong, J. C. de; Wermenbol, A. G.; Verweij-Uijterwaal, M. W.; Slaterus, K. W.; Wertheim-Van Dillen, P.; van Doornum, G. J.; Khoo, S. H.; Hierholzer, J. C.: Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. In: *Journal of clinical microbiology* 37 (1999) 12, S. 3940–45.
- [19] Segerman, A.; Arnberg, N.; Erikson, A.; Lindman, K.; Wadell, G.: There Are Two Different Species B Adenovirus Receptors. SBAR, Common to Species B1 and B2 Adenoviruses, and sB2AR, Exclusively Used by Species B2 Adenoviruses. In: *Journal of Virology* 77 (2003) 2, S. 1157–62.
- [20] Jornvall, H.; Akusjarvi, G.; Alestrom, P.; Bahr-Lindstrom, H. von; Pettersson, U.; Appella, E.; Fowler, A. V.; Philipson, L.: The adenovirus hexon protein. The primary structure of the polypeptide and its correlation with the hexon gene. In: *The Journal of biological chemistry* 256 (1981) 12, S. 6181–86.
- [21] Rux, J. J.; Kuser, P. R.; Burnett, R. M.: Structural and Phylogenetic Analysis of Adenovirus Hexons by Use of High-Resolution X-Ray Crystallographic, Molecular Modeling, and Sequence-Based Methods. In: *Journal of Virology* 77 (2003) 17, S. 9553–66.
- [22] Veltrop-Duits, L. A.; Heemskerk, B.; Sombroek, C. C.; van Vreeswijk, T.; Gubbels, S.; Toes, R. E. M.; Melief, C. J. M.; Franken, Kees L M C; Havenga, M.; van

- Tol, Maarten J D; Schilham, M. W.: Human CD4+ T cells stimulated by conserved adenovirus 5 hexon peptides recognize cells infected with different species of human adenovirus. In: *European journal of immunology* 36 (2006) 9, S. 2410–23.
- [23] Tang, J.; Olive, M.; Champagne, K.; Flomenberg, N.; Eisenlohr, L.; Hsu, S.; Flomenberg, P.: Adenovirus hexon T-cell epitope is recognized by most adults and is restricted by HLA DP4, the most common class II allele. In: *Gene therapy* 11 (2004) 18, S. 1408–15.
- [24] Olive, M.; Eisenlohr, L.; Flomenberg, N.; Hsu, S.; Flomenberg, P.: The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4+ T-cell epitope. In: *Human gene therapy* 13 (2002) 10, S. 1167–78.
- [25] Heemskerk, B.; Veltrop-Duits, L. A.; van Vreeswijk, T.; Dam, M. M. ten; Heidt, S.; Toes, R. E. M.; van Tol, Maarten J D; Schilham, M. W.: Extensive cross-reactivity of CD4+ adenovirus-specific T cells: implications for immunotherapy and gene therapy. In: *Journal of Virology* 77 (2003) 11, S. 6562–66.
- [26] Smith, C. A.; Woodruff, L. S.; Rooney, C.; Kitchingman, G. R.: Extensive cross-reactivity of adenovirus-specific cytotoxic T cells. In: *Human gene therapy* 9 (1998) 10, S. 1419–27.
- [27] Roelvink, P. W.; Lizonova, A.; Lee, J. G.; Li, Y.; Bergelson, J. M.; Finberg, R. W.; Brough, D. E.; Kovesdi, I.; Wickham, T. J.: The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. In: *Journal of Virology* 72 (1998) 10, S. 7909–15.
- [28] Gaggar, A.; Shayakhmetov, D. M.; Lieber, A.: CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. In: *Nature medicine* 9 (2003) 11, S. 1408–12.
- [29] Feuchtinger, T.; Lang, P.; Handgretinger, R.: Adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. In: *Leukemia & lymphoma* 48 (2007) 2, S. 244–55.
- [30] Arnberg, N.; Pring-Akerblom, P.; Wadell, G.: Adenovirus Type 37 Uses Sialic Acid as a Cellular Receptor on Chang C Cells. In: *Journal of Virology* 76 (2002) 17, S. 8834–41.
- [31] Russell, W. C.: Update on adenovirus and its vectors. In: *The Journal of general virology* 81 (2000) Pt 11, S. 2573–604.
- [32] Neumeister, B.; Braun, R.; K. Geiss, H.; Kimmig, P.: *Mikrobiologische Diagnostik*, 2., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart 2009.

- [33] Sester, M.; Sester, U.; Alarcon Salvador, S.; Heine, G.; Lipfert, S.; Girndt, M.; Gartner, B.; Kohler, H.: Age-related decrease in adenovirus-specific T cell responses. In: *The Journal of infectious diseases* 185 (2002) 10, S. 1379–87.
- [34] Leibold, J.; Feucht, J.; Halder, A.; Stevanovic, S.; Kayser, S.; Handgretinger, R.; Feuchtinger, T.: Induction of Thelper1-driven antiviral T-cell lines for adoptive immunotherapy is determined by differential expression of IFN-gamma and T-cell activation markers. In: *Journal of immunotherapy* (Hagerstown, Md. : 1997) 35 (2012) 9, S. 661–69.
- [35] Garnett, C. T.; Erdman, D.; Xu, W.; Gooding, L. R.: Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. In: *Journal of Virology* 76 (2002) 21, S. 10608–16.
- [36] Adrian, T.; Schafer, G.; Cooney, M. K.; Fox, J. P.; Wigand, R.: Persistent enteral infections with adenovirus types 1 and 2 in infants: no evidence of reinfection. In: *Epidemiology and infection* 101 (1988) 3, S. 503–09.
- [37] Hellenbrand, W.; Thierfelder, W.; Muller-Pebody, B.; Hamouda, O.; Breuer, T.: Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997-1998. In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 24 (2005) 2, S. 131–35.
- [38] Kudesia, G.; Partridge, S.; Farrington, C. P.; Soltanpoor, N.: Changes in age related seroprevalence of antibody to varicella zoster virus: impact on vaccine strategy. In: *Journal of clinical pathology* 55 (2002) 2, S. 154–55.
- [39] Heininger, U.; Braun-Fahrlander, C.; Desgrandchamps, D.; Glaus, J.; Grize, L.; Wutzler, P.; Schaad, U. B.: Seroprevalence of varicella-zoster virus immunoglobulin G antibodies in Swiss adolescents and risk factor analysis for seronegativity. In: *The Pediatric infectious disease journal* 20 (2001) 8, S. 775–78.
- [40] Cohen, J. I.; Seidel, K. E.: Varicella-zoster virus open reading frame 1 encodes a membrane protein that is dispensable for growth of VZV in vitro. In: *Virology* 206 (1995) 2, S. 835–42.
- [41] Akhtar, J.; Shukla, D.: Viral entry mechanisms. Cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. In: *The FEBS journal* 276 (2009) 24, S. 7228–36.



- [42] Friedman, H. M.: Immune evasion by herpes simplex virus type 1, strategies for virus survival. In: Transactions of the American Clinical and Climatological Association 114 (2003), S. 103–12.
- [43] Laquerre, S.; Argnani, R.; Anderson, D. B.; Zucchini, S.; Manservigi, R.; Glorioso, J. C.: Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. In: Journal of Virology 72 (1998) 7, S. 6119–30.
- [44] Chen, J. J.; Zhu, Z.; Gershon, A. A.; Gershon, M. D.: Mannose 6-phosphate receptor dependence of varicella zoster virus infection in vitro and in the epidermis during varicella and zoster. In: Cell 119 (2004) 7, S. 915–26.
- [45] Akhtar, J.; Tiwari, V.; Oh, M.-J.; Kovacs, M.; Jani, A.; Kovacs, S. K.; Valyi-Nagy, T.; Shukla, D.: HVEM and nectin-1 are the major mediators of herpes simplex virus 1 (HSV-1) entry into human conjunctival epithelium. In: Investigative ophthalmology & visual science 49 (2008) 9, S. 4026–35.
- [46] Nicola, A. V.; McEvoy, A. M.; Straus, S. E.: Roles for Endocytosis and Low pH in Herpes Simplex Virus Entry into HeLa and Chinese Hamster Ovary Cells. In: Journal of Virology 77 (2003) 9, S. 5324–32.
- [47] Kim, I.-J.; Chouljenko, V. N.; Walker, J. D.; Kousoulas, K. G.: Herpes simplex virus 1 glycoprotein M and the membrane-associated protein UL11 are required for virus-induced cell fusion and efficient virus entry. In: Journal of Virology 87 (2013) 14, S. 8029–37.
- [48] Clarke, P.; Beer, T.; Cohrs, R.; Gilden, D. H.: Configuration of latent varicella-zoster virus DNA. In: Journal of Virology 69 (1995) 12, S. 8151–54.
- [49] Even, D. L.; Henley, A. M.; Geraghty, R. J.: The requirements for herpes simplex virus type 1 cell-cell spread via nectin-1 parallel those for virus entry. In: Virus research 119 (2006) 2, S. 195–207.
- [50] Nicoll, M. P.; Hann, W.; Shivkumar, M.; Harman, L. E. R.; Connor, V.; Coleman, H. M.; Proenca, J. T.; Efsthathiou, S.: The HSV-1 Latency-Associated Transcript Functions to Repress Latent Phase Lytic Gene Expression and Suppress Virus Reactivation from Latently Infected Neurons. In: PLoS pathogens 12 (2016) 4, e1005539.
- [51] Kubat, N. J.; Amelio, A. L.; Giordani, N. V.; Bloom, D. C.: The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer/rcr is hyperacetylated during

latency independently of LAT transcription. In: *Journal of Virology* 78 (2004) 22, S. 12508–18.

[52] Roberts, C. M.; Pfister, J. R.; Spear, S. J.: Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students. In: *Sexually transmitted diseases* 30 (2003) 10, S. 797–800.

[53] Kim, M.; Taylor, J.; Sidney, J.; Mikloska, Z.; Bodsworth, N.; Lagios, K.; Dunckley, H.; Byth-Wilson, K.; Denis, M.; Finlayson, R.; Khanna, R.; Sette, A.; Cunningham, A. L.: Immunodominant Epitopes in Herpes Simplex Virus Type 2 Glycoprotein D Are Recognized by CD4 Lymphocytes from Both HSV-1 and HSV-2 Seropositive Subjects. In: *The Journal of Immunology* 181 (2008) 9, S. 6604–15.

[54] BenMohamed, L.; Bertrand, G.; McNamara, C. D.; Gras-Masse, H.; Hammer, J.; Wechsler, S. L.; Nesburn, A. B.: Identification of Novel Immunodominant CD4+ Th1-Type T-Cell Peptide Epitopes from Herpes Simplex Virus Glycoprotein D That Confer Protective Immunity. In: *Journal of Virology* 77 (2003) 17, S. 9463–73.

[55] Wallace, M. E.; Keating, R.; Heath, W. R.; Carbone, F. R.: The cytotoxic T-cell response to herpes simplex virus type 1 infection of C57BL/6 mice is almost entirely directed against a single immunodominant determinant. In: *Journal of Virology* 73 (1999) 9, S. 7619–26.

[56] van Velzen, M.; Jing, L.; Osterhaus, Albert D M E; Sette, A.; Koelle, D. M.; Verjans, Georges M G M: Local CD4 and CD8 T-cell reactivity to HSV-1 antigens documents broad viral protein expression and immune competence in latently infected human trigeminal ganglia. In: *PLoS pathogens* 9 (2013) 8, e1003547.

[57] Platt, R. J.; Khodai, T.; Townend, T. J.; Bright, H. H.; Cockle, P.; Perez-Tosar, L.; Webster, R.; Champion, B.; Hickling, T. P.; Mirza, F.: CD8+ T Lymphocyte Epitopes From The Herpes Simplex Virus Type 2 ICP27, VP22 and VP13/14 Proteins To Facilitate Vaccine Design And Characterization. In: *Cells* 2 (2013) 1, S. 19–42.

[58] Banks, T. A.; Nair, S.; Rouse, B. T.: Recognition by and in vitro induction of cytotoxic T lymphocytes against predicted epitopes of the immediate-early protein ICP27 of herpes simplex virus. In: *Journal of Virology* 67 (1993) 1, S. 613–16.

[59] Johnson, A. J.; Chu, C.-F.; Milligan, G. N.: Effector CD4+ T-cell involvement in clearance of infectious herpes simplex virus type 1 from sensory ganglia and spinal cords. In: *Journal of Virology* 82 (2008) 19, S. 9678–88.

- [60] Simmons, A.: Anti-CD8 impairs clearance of herpes simplex virus from the nervous system. Implications for the fate of virally infected neurons. In: *Journal of Experimental Medicine* 175 (1992) 5, S. 1337–44.
- [61] Macleod, B. L.; Bedoui, S.; Hor, J. L.; Mueller, S. N.; Russell, T. A.; Hollett, N. A.; Heath, W. R.; Tschärke, D. C.; Brooks, A. G.; Gebhardt, T.: Distinct APC subtypes drive spatially segregated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell effector activity during skin infection with HSV-1. In: *PLoS pathogens* 10 (2014) 8, e1004303.
- [62] Khanna, K. M.; Lepisto, A. J.; Decman, V.; Hendricks, R. L.: Immune control of herpes simplex virus during latency. In: *Current opinion in immunology* 16 (2004) 4, S. 463–69.
- [63] Khan, A. A.; Srivastava, R.; Spencer, D.; Garg, S.; Fremgen, D.; Vahed, H.; Lopes, P. P.; Pham, T. T.; Hewett, C.; Kuang, J.; Ong, N.; Huang, L.; Scarfone, V. M.; Nesburn, A. B.; Wechsler, S. L.; BenMohamed, L.: Phenotypic and functional characterization of herpes simplex virus glycoprotein B epitope-specific effector and memory CD8<sup>+</sup> T cells from symptomatic and asymptomatic individuals with ocular herpes. In: *Journal of Virology* 89 (2015) 7, S. 3776–92.
- [64] Baird, N. L.; Bowlin, J. L.; Hotz, T. J.; Cohrs, R. J.; Gilden, D.: Interferon Gamma Prolongs Survival of Varicella-Zoster Virus-Infected Human Neurons In Vitro. In: *Journal of Virology* 89 (2015) 14, S. 7425–27.
- [65] Mehta, S. K.; Cohrs, R. J.; Forghani, B.; Zerbe, G.; Gilden, D. H.; Pierson, D. L.: Stress-induced subclinical reactivation of varicella zoster virus in astronauts. In: *Journal of medical virology* 72 (2004) 1, S. 174–79.
- [66] Weinberg, A.; Levin, M. J.: VZV T cell-mediated immunity. In: *Current topics in microbiology and immunology* 342 (2010), S. 341–57.
- [67] Arvin, A. M.; Sharp, M.; Smith, S.; Koropchak, C. M.; Diaz, P. S.; Kinchington, P.; Ruyechan, W.; Hay, J.: Equivalent recognition of a varicella-zoster virus immediate early protein (IE62) and glycoprotein I by cytotoxic T lymphocytes of either CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> phenotype. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 146 (1991) 1, S. 257–64.
- [68] Sadzot-Delvaux, C.; Arvin, A. M.; Rentier, B.: Varicella-zoster virus IE63, a virion component expressed during latency and acute infection, elicits humoral and cellular immunity. In: *The Journal of infectious diseases* 178 Suppl 1 (1998), S43-7.

- [69] Bergen, R. E.; Sharp, M.; Sanchez, A.; Judd, A. K.; Arvin, A. M.: Human T cells recognize multiple epitopes of an immediate early/tegument protein (IE62) and glycoprotein I of varicella zoster virus. In: *Viral immunology* 4 (1991) 3, S. 151–66.
- [70] Arvin, A. M.: Cell-mediated immunity to varicella-zoster virus. In: *The Journal of infectious diseases* 166 Suppl 1 (1992), S35-41.
- [71] Kleemann, P.; Distler, E.; Wagner, E. M.; Thomas, S.; Klobuch, S.; Aue, S.; Schnurer, E.; Schild, H.; Theobald, M.; Plachter, B.; Tenzer, S.; Meyer, R. G.; Herr, W.: Varicella-zoster virus glycoproteins B and E are major targets of CD4+ and CD8+ T cells reconstituting during zoster after allogeneic transplantation. In: *Haematologica* 97 (2012) 6, S. 874–82.
- [72] Malavige, G. N.; Jones, L.; Black, A. P.; Ogg, G. S.: Varicella zoster virus glycoprotein E-specific CD4+ T cells show evidence of recent activation and effector differentiation, consistent with frequent exposure to replicative cycle antigens in healthy immune donors. In: *Clinical and experimental immunology* 152 (2008) 3, S. 522–31.
- [73] Huang, W.; Xie, P.; Xu, M.; Li, P.; Zao, G.: The influence of stress factors on the reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in infected mice. In: *Cell biochemistry and biophysics* 61 (2011) 1, S. 115–22.
- [74] Herget, G. W.; Riede, U. N.; Schmitt-Graff, A.; Lubbert, M.; Neumann-Haefelin, D.; Kohler, G.: Generalized herpes simplex virus infection in an immunocompromised patient--report of a case and review of the literature. In: *Pathology, research and practice* 201 (2005) 2, S. 123–29.
- [75] Raschilas, F.; Wolff, M.; Delatour, F.; Chaffaut, C.; Broucker, T. de; Chevret, S.; Lebon, P.; Canton, P.; Rozenberg, F.: Outcome of and prognostic factors for herpes simplex encephalitis in adult patients: results of a multicenter study. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 35 (2002) 3, S. 254–60.
- [76] Brodoefel, H.; Vogel, M.; Spira, D.; Faul, C.; Beck, R.; Claussen, C. D.; Horger, M.: Herpes-Simplex-Virus 1 pneumonia in the immunocompromised host: high-resolution CT patterns in correlation to outcome and follow-up. In: *European journal of radiology* 81 (2012) 4, e415-20.

- [77] Choo, P. W.; Donahue, J. G.; Manson, J. E.; Platt, R.: The epidemiology of varicella and its complications. In: *The Journal of infectious diseases* 172 (1995) 3, S. 706–12.
- [78] Ramachandra, S.; Metta, A. K.; Haneef, N. S.; Kodali, S.: Fetal varicella syndrome. In: *Indian journal of dermatology, venereology and leprology* 76 (2010) 6, S. 724.
- [79] Mueller, N. H.; Gilden, D. H.; Cohrs, R. J.; Mahalingam, R.; Nagel, M. A.: Varicella zoster virus infection: clinical features, molecular pathogenesis of disease, and latency. In: *Neurologic clinics* 26 (2008) 3, 675-97, viii.
- [80] Takahashi, M.; Otsuka, T.; Okuno, Y.; Asano, Y.; Yazaki, T.: Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. In: *Lancet (London, England)* 2 (1974) 7892, S. 1288–90.
- [81] Habermehl, P.; Lignitz, A.; Knuf, M.; Schmitt, H. J.; Slaoui, M.; Zepp, F.: Cellular immune response of a varicella vaccine following simultaneous DTaP and VZV vaccination. In: *Vaccine* 17 (1999) 7-8, S. 669–74.
- [82] Sei, J. J.; Cox, K. S.; Dubey, S. A.; Antonello, J. M.; Krah, D. L.; Casimiro, D. R.; Vora, K. A.: Effector and Central Memory Poly-Functional CD4(+) and CD8(+) T Cells are Boosted upon ZOSTAVAX((R)) Vaccination. In: *Frontiers in immunology* 6 (2015), S. 553.
- [83] Czerkinsky, C. C.; Nilsson, L. A.; Nygren, H.; Ouchterlony, O.; Tarkowski, A.: A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. In: *Journal of immunological methods* 65 (1983) 1-2, S. 109–21.
- [84] Czerkinsky, C.; Andersson, G.; Ekre, H. P.; Nilsson, L. A.; Klareskog, L.; Ouchterlony, O.: Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. In: *Journal of immunological methods* 110 (1988) 1, S. 29–36.
- [85] Gessner, A.; Moskopididis, D.; Lehmann-Grube, F.: Enumeration of single IFN-gamma-producing cells in mice during viral and bacterial infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 142 (1989) 4, S. 1293–98.
- [86] Richeldi, L.; Losi, M.; Cerri, S.; Casali, L.; Fabbri, L. M.; Ferrara, G.: Using ELISpot technology to improve the diagnosis of tuberculosis infection: from the bench

to the T-SPOT.TB assay. In: Expert review of respiratory medicine 2 (2008) 2, S. 253–60.

[87] Ewer, K.; Deeks, J.; Alvarez, L.; Bryant, G.; Waller, S.; Andersen, P.; Monk, P.; Lalvani, A.: Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in a school tuberculosis outbreak. In: The Lancet 361 (2003) 9364, S. 1168–73.

[88] Herr, W.; Schneider, J.; Lohse, A. W.; Meyer zum Buschenfelde, K H; Wolfel, T.: Detection and quantification of blood-derived CD8+ T lymphocytes secreting tumor necrosis factor alpha in response to HLA-A2.1-binding melanoma and viral peptide antigens. In: Journal of immunological methods 191 (1996) 2, S. 131–42.

[89] Power, C. A.; Grand, C. L.; Ismail, N.; Peters, N. C.; Yurkowski, D. P.; Bretscher, P. A.: A valid ELISPOT assay for enumeration of ex vivo, antigen-specific, IFNgamma-producing T cells. In: Journal of immunological methods 227 (1999) 1-2, S. 99–107.

[90] Feuchtinger, T.; Richard, C.; Pfeiffer, M.; Neuhauser, F.; Lucke, J.; Handgretinger, R.; Greil, J.; Bader, P.; Klingebiel, T.; Schlegel, P.-G.; Jahn, G.; Niethammer, D.; Lang, P.: Adenoviral infections after transplantation of positive selected stem cells from haploidentical donors in children: an update. In: Klinische Padiatrie 217 (2005) 6, S. 339–44.

[91] La Rosa, A. M.; Champlin, R. E.; Mirza, N.; Gajewski, J.; Giralt, S.; Rolston, K. V.; Raad, I.; Jacobson, K.; Kontoyiannis, D.; Elting, L.; Whimbey, E.: Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. In: Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 32 (2001) 6, S. 871–76.

[92] Feucht, J.; Joachim, L.; Lang, P.; Feuchtinger, T.: Adoptive T-cell transfer for refractory viral infections with cytomegalovirus, Epstein-Barr virus or adenovirus after allogeneic stem cell transplantation. In: Klinische Padiatrie 225 (2013) 3, S. 164–69.

[93] Luyt, C.-E.; Brechot, N.; Chastre, J.: What role do viruses play in nosocomial pneumonia? In: Current opinion in infectious diseases 27 (2014) 2, S. 194–99.

[94] Sadaoka, K.; Okamoto, S.; Gomi, Y.; Tanimoto, T.; Ishikawa, T.; Yoshikawa, T.; Asano, Y.; Yamanishi, K.; Mori, Y.: Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity: comparison between VZV skin test and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay. In: The Journal of infectious diseases 198 (2008) 9, S. 1327–33.

- [95] Gershon, A. A.; Hambleton, S.: Varicella vaccine for susceptible adults: do it today. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 39 (2004) 11, S. 1640–41.
- [96] Feuchtinger, T.; Matthes-Martin, S.; Richard, C.; Lion, T.; Fuhrer, M.; Hamprecht, K.; Handgretinger, R.; Peters, C.; Schuster, F. R.; Beck, R.; Schumm, M.; Lotfi, R.; Jahn, G.; Lang, P.: Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. In: *British journal of haematology* 134 (2006) 1, S. 64–76.
- [97] Serangeli, C.; Bicanic, O.; Scheible, M. H.; Wernet, D.; Lang, P.; Rammensee, H.-G.; Stevanovic, S.; Handgretinger, R.; Feuchtinger, T.: Ex vivo detection of adenovirus specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses to HLA-DR-epitopes of the Hexon protein show a contracted specificity of T(HELPER) cells following stem cell transplantation. In: *Virology* 397 (2010) 2, S. 277–84.
- [98] Kessler, T.; Hamprecht, K.; Feuchtinger, T.; Jahn, G.: Dendritic cells are susceptible to infection with wild-type adenovirus, inducing a differentiation arrest in precursor cells and inducing a strong T-cell stimulation. In: *The Journal of general virology* 91 (2010) Pt 5, S. 1150–54.
- [99] Miron, M.-J.; Blanchette, P.; Groitl, P.; Dallaire, F.; Teodoro, J. G.; Li, S.; Dobner, T.; Branton, P. E.: Localization and importance of the adenovirus E4orf4 protein during lytic infection. In: *Journal of Virology* 83 (2009) 4, S. 1689–99.
- [100] Harper, D. R.; Mathieu, N.; Mullarkey, J.: High-titre, cryostable cell-free varicella zoster virus. In: *Archives of virology* 143 (1998) 6, S. 1163–70.
- [101] Gates, I. V.; Zhang, Y.; Shambaugh, C.; Bauman, M. A.; Tan, C.; Bodmer, J.-L.: Quantitative measurement of varicella-zoster virus infection by semiautomated flow cytometry. In: *Applied and environmental microbiology* 75 (2009) 7, S. 2027–36.
- [102] Brunell, P. A.: Separation of infectious Varicella-Zoster virus from human embryonic lung fibroblasts. In: *Virology* 31 (1967) 4, S. 732–34.
- [103] Lieber, D.; Bailer, S. M.: Determination of HSV-1 infectivity by plaque assay and a luciferase reporter cell line. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1064 (2013), S. 171–81.
- [104] Ilobi, C. P.; Martin, B. A.: A simple and sensitive assay for varicella-zoster virus. In: *Journal of virological methods* 23 (1989) 2, S. 137–48.

- [105] Feuchtinger, T.; Richard, C.; Joachim, S.; Scheible, M. H.; Schumm, M.; Hamprecht, K.; Martin, D.; Jahn, G.; Handgretinger, R.; Lang, P.: Clinical grade generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. In: *Journal of immunotherapy* (Hagerstown, Md. : 1997) 31 (2008) 2, S. 199–206.
- [106] Hutnick, N. A.; Carnathan, D.; Demers, K.; Makedonas, G.; Ertl, H. C. J.; Betts, M. R.: Adenovirus-specific human T cells are pervasive, polyfunctional, and cross-reactive. In: *Vaccine* 28 (2010) 8, S. 1932–41.
- [107] Olive, M.; Eisenlohr, L. C.; Flomenberg, P.: Quantitative analysis of adenovirus-specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses from healthy adults. In: *Viral immunology* 14 (2001) 4, S. 403–13.
- [108] Flomenberg, P.; Babbitt, J.; Drobyski, W. R.; Ash, R. C.; Carrigan, D. R.; Sedmak, G. V.; McAuliffe, T.; Camitta, B.; Horowitz, M. M.; Bunin, N.; Casper, J. T.: Increasing Incidence of Adenovirus Disease in Bone Marrow Transplant Recipients. In: *Journal of Infectious Diseases* 169 (1994) 4, S. 775–81.
- [109] Onion, D.; Crompton, L. J.; Milligan, D. W.; Moss, P. A. H.; Lee, S. P.; Mautner, V.: The CD4<sup>+</sup> T-cell response to adenovirus is focused against conserved residues within the hexon protein. In: *The Journal of general virology* 88 (2007) Pt 9, S. 2417–25.
- [110] Tang, J.; Olive, M.; Pulmanausahakul, R.; Schnell, M.; Flomenberg, N.; Eisenlohr, L.; Flomenberg, P.: Human CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell responses to adenovirus capsid proteins. In: *Virology* 350 (2006) 2, S. 312–22.
- [111] Leen, A. M.; Sili, U.; Vanin, E. F.; Jewell, A. M.; Xie, W.; Vignali, D.; Piedra, P. A.; Brenner, M. K.; Rooney, C. M.: Conserved CTL epitopes on the adenovirus hexon protein expand subgroup cross-reactive and subgroup-specific CD8<sup>+</sup> T cells. In: *Blood* 104 (2004) 8, S. 2432–40.
- [112] Leen, A. M.; Christin, A.; Khalil, M.; Weiss, H.; Gee, A. P.; Brenner, M. K.; Heslop, H. E.; Rooney, C. M.; Bollard, C. M.: Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy. In: *Journal of Virology* 82 (2008) 1, S. 546–54.
- [113] Haveman, L. M.; Bierings, M.; Legger, E.; Klein, M. R.; Jager, W. de; Otten, H. G.; Albani, S.; Kuis, W.; Sette, A.; Prakken, B. J.: Novel pan-DR-binding T cell epitopes



of adenovirus induce pro-inflammatory cytokines and chemokines in healthy donors. In: *International immunology* 18 (2006) 11, S. 1521–29.

[114] Flomenberg, P.; Piaskowski, V.; Truitt, R. L.; Casper, J. T.: Characterization of human proliferative T cell responses to adenovirus. In: *The Journal of infectious diseases* 171 (1995) 5, S. 1090–96.

[115] Sparer, T. E.; Wynn, S. G.; Clark, D. J.; Kaplan, J. M.; Cardoza, L. M.; Wadsworth, S. C.; Smith, A. E.; Gooding, L. R.: Generation of cytotoxic T lymphocytes against immunorecessive epitopes after multiple immunizations with adenovirus vectors is dependent on haplotype. In: *Journal of Virology* 71 (1997) 3, S. 2277–84.

[116] Rawle, F. C.; Knowles, B. B.; Ricciardi, R. P.; Brahmacheri, V.; Duerksen-Hughes, P.; Wold, W. S.; Gooding, L. R.: Specificity of the mouse cytotoxic T lymphocyte response to adenovirus 5. E1A is immunodominant in H-2b, but not in H-2d or H-2k mice. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 146 (1991) 11, S. 3977–84.

[117] Schmitz, H.; Wigand, R.; Heinrich, W.: Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. In: *American journal of epidemiology* 117 (1983) 4, S. 455–66.

[118] Anderson, E. J.; Guzman-Cottrill, J. A.; Kletzel, M.; Thormann, K.; Sullivan, C.; Zheng, X.; Katz, B. Z.: High-risk adenovirus-infected pediatric allogeneic hematopoietic progenitor cell transplant recipients and preemptive cidofovir therapy. In: *Pediatric transplantation* 12 (2008) 2, S. 219–27.

[119] Runde, V.; Ross, S.; Trenchel, R.; Lagemann, E.; Basu, O.; Renzing-Kohler, K.; Schaefer, U. W.; Roggendorf, M.; Holler, E.: Adenoviral infection after allogeneic stem cell transplantation (SCT): report on 130 patients from a single SCT unit involved in a prospective multi center surveillance study. In: *Bone marrow transplantation* 28 (2001) 1, S. 51–57.

[120] Feuchtinger, T.; Lucke, J.; Hamprecht, K.; Richard, C.; Handgretinger, R.; Schumm, M.; Greil, J.; Bock, T.; Niethammer, D.; Lang, P.: Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. In: *British journal of haematology* 128 (2005) 4, S. 503–09.

[121] Chakrabarti, S.; Mautner, V.; Osman, H.; Collingham, K. E.; Fegan, C. D.; Klapper, P. E.; Moss, P. A. H.; Milligan, D. W.: Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft

manipulation, immunosuppression, and immune recovery. In: *Blood* 100 (2002) 5, S. 1619–27.

[122] Maheshwari, G.; Jannat, R.; McCormick, L.; Hsu, D.: Thermal inactivation of adenovirus type 5. In: *Journal of virological methods* 118 (2004) 2, S. 141–46.

[123] Alexander, J.; Ward, S.; Mendy, J.; Manayani, D. J.; Farness, P.; Avanzini, J. B.; Guenther, B.; Garduno, F.; Jow, L.; Snarsky, V.; Ishioka, G.; Dong, X.; Lo Vang; Newman, M. J.; Mayall, T.: Pre-clinical evaluation of a replication-competent recombinant adenovirus serotype 4 vaccine expressing influenza H5 hemagglutinin. In: *PloS one* 7 (2012) 2, e31177.

[124] Kather, A.; Raftery, M. J.; Devi-Rao, G.; Lippmann, J.; Giese, T.; Sandri-Goldin, R. M.; Schonrich, G.: Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced apoptosis in human dendritic cells as a result of downregulation of cellular FLICE-inhibitory protein and reduced expression of HSV-1 antiapoptotic latency-associated transcript sequences. In: *Journal of Virology* 84 (2010) 2, S. 1034–46.

[125] Chiara, G. de; Marcocci, M. E.; Civitelli, L.; Argnani, R.; Piacentini, R.; Ripoli, C.; Manservigi, R.; Grassi, C.; Garaci, E.; Palamara, A. T.: APP processing induced by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) yields several APP fragments in human and rat neuronal cells. In: *PloS one* 5 (2010) 11, e13989.

[126] Samudio, I.; Rezvani, K.; Shaim, H.; Hofs, E.; Ngom, M.; Bu, L.; Liu, G.; Lee, J. T. C.; Imren, S.; Lam, V.; Poon, G. F. T.; Ghaedi, M.; Takei, F.; Humphries, K.; Jia, W.; Krystal, G.: UV-inactivated HSV-1 potently activates NK cell killing of leukemic cells. In: *Blood* 127 (2016) 21, S. 2575–86.

[127] Redman, R. L.; Nader, S.; Zerboni, L.; Liu, C.; Wong, R. M.; Brown, B. W.; Arvin, A. M.: Early Reconstitution of Immunity and Decreased Severity of Herpes Zoster in Bone Marrow Transplant Recipients Immunized with Inactivated Varicella Vaccine. In: *The Journal of Infectious Diseases* 176 (1997) 3, S. 578–85.

[128] Pathogen Regulation Directorate, Public Health Agency of Canada: VARICELLA-ZOSTER VIRUS PATHOGEN SAFETY DATA SHEET - INFECTIOUS SUBSTANCES (2011). Abrufdatum 30.04.2012.

[129] Arvin, A. M.; Gershon, A. A. (Hrsg.): *Varicella-zoster virus. Virology and clinical management.* Cambridge 2000.

[130] Smith, J. G.; Liu, X.; Kaufhold, R. M.; Clair, J.; Caulfield, M. J.: Development and validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular

immune responses to varicella-zoster virus. In: Clinical and diagnostic laboratory immunology 8 (2001) 5, S. 871–79.

[131] Salem Fourati, I.; Grenier, A.-J.; Jolette, E.; Merindol, N.; Ovetchkine, P.; Soudeyns, H.: Development of an IFN-gamma ELISpot assay to assess varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity following umbilical cord blood transplantation. In: Journal of visualized experiments : JoVE (2014) 89.

[132] Manickan, E.; Rouse, B. T.: Roles of different T-cell subsets in control of herpes simplex virus infection determined by using T-cell-deficient mouse-models. In: Journal of Virology 69 (1995) 12, S. 8178–79.

[133] Mikloska, Z.; Cunningham, A. L.: Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. In: The Journal of general virology 79 (Pt 2) (1998), S. 353–61.

[134] Mikloska, Z.; Kesson, A. M.; Penfold, M. E. T.; Cunningham, A. L.: Herpes Simplex Virus Protein Targets for CD4 and CD8 Lymphocyte Cytotoxicity in Cultured Epidermal Keratinocytes Treated with Interferon-. In: Journal of Infectious Diseases 173 (1996) 1, S. 7–17.

[135] Li, H.; Yang, L.; Zheng, C.-Y.; Wang, J.; Abdullah, A. S.: Use of bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. In: The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease 16 (2012) 12, S. 1668–73.

[136] Posavad, C. M.; Wald, A.; Hosken, N.; Huang, M. L.; Koelle, D. M.; Ashley, R. L.; Corey, L.: T Cell Immunity to Herpes Simplex Viruses in Seronegative Subjects. Silent Infection or Acquired Immunity? In: The Journal of Immunology 170 (2003) 8, S. 4380–88.

[137] Wiegand, J.; Meya, S.; Schlaphoff, V.; Manns, M. P.; Mossner, J.; Wedemeyer, H.; Tillmann, H. L.: HBV-specific T-cell responses in healthy seronegative sexual partners of patients with chronic HBV infection. In: Journal of viral hepatitis 17 (2010) 9, S. 631–39.

[138] Smith, J. G.; Levin, M.; Vessey, R.; Chan, I. S. F.; Hayward, A. R.; Liu, X.; Kaufhold, R. M.; Clair, J.; Chalikonda, I.; Chan, C.; Bernard, M.; Wang, W. W.; Keller, P.; Caulfield, M. J.: Measurement of cell-mediated immunity with a Varicella-Zoster

Virus-specific interferon-gamma ELISPOT assay: responses in an elderly population receiving a booster immunization. In: Journal of medical virology 70 Suppl 1 (2003), S38-41.

[139] Wutzler, P.; Farber, I.; Wagenpfeil, S.; Bisanz, H.; Tischer, A.: Seroprevalence of varicella-zoster virus in the German population. In: Vaccine 20 (2001) 1-2, S. 121–24.

## **8. Danksagung**

Zu allererst möchte ich Prof. Dr. Dr. André Gessner danken, dass er mir eine Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsklinik Regensburg ermöglichte.

Des Weiteren danke ich Dr. Josef Köstler für seine jahrelange, hervorragende Betreuung und dafür, dass er mir stets mit gutem Rat zur Seite stand und immer bestrebt war, auch in schwierigen Situationen eine gute Lösung zu finden.

Mein großer Dank gilt insbesondere Sylvia Allmeier und Eveline Lang, die sich bereit erklärten, ihren Arbeitsplatz mit mir zu teilen und mir während meiner ganzen Zeit im Labor stets eine große Hilfe waren. Danke auch für die große Geduld, die ihr bei den vielen Erklärungen und Erläuterungen aufgebracht habt.

Vielen lieben Dank an Karin Lukas für die geduldige Einarbeitung und Betreuung und für all die Mühen, die teilweise bis in den späten Abend gingen.

Bei Matthias Vogel möchte ich mich herzlich für die zeitintensive Hilfe und all die Geduld während der Durchführung der ELISA-Tests bedanken.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinem Freund Sebastian für den Rückhalt und die emotionale Unterstützung während dieser ganzen Zeit.